



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“PRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO MEDIANTE VITRIFICACIÓN Y
CONGELAMIENTO LENTO, UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES
COMERCIALES”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Prevía la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR

JORGE LUIS ESCUDERO POZO

Riobamba-Ecuador

2015

Este Trabajo de Titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Ing. M.C. Vicente Rafael Trujillo Villacís.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.C. Luis Alberto Peña Serrano.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing. M.C. Hermenegildo Díaz Berrones.

ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba, 27 de octubre del 2015.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación dedico a mi querida esposa e hija, Sophia y Jael soporte de mis anhelos y mis sueños por cumplir, mis más hermosos tesoros hallados, razón de mí existir y sobre todo un ejemplo de constancia y esfuerzo para un mañana prometedora. A mis padres Hugo y Carmen, que me han dado su apoyo incondicional en cada uno de mis objetivos planteados, quienes han sido el pilar fundamental de mi educación. A mis hermanos Franklin, Christian y Andrés, gracias por todo su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso que siempre me ha guiado, protegido y me ha dado fuerzas para seguir adelante en mis estudios, en lo personal y ha hecho mi sueño realidad, siempre he confiado en Él, y estaré muy agradecido por cada día más de vida. Al Ing. Guillermo Villa por la enseñanza y paciencia que supo brindarme en el transcurso de mi proyecto, al Ing. Luis Peña por darme la oportunidad de fortalecer mis conocimientos, y a todos quienes me apoyaron y confiaron plenamente en mis capacidades para alcanzar una meta más en mi vida.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR	3
1. <u>Aparato genital del macho</u>	3
a. Testículos	3
b. Epidídimo	3
c. Conductos deferentes	3
d. Glándulas anexas	4
e. Pene	4
f. Prepucio	4
2. <u>Eyaculación</u>	5
3. <u>Ritmos anuales de reproducción del macho</u>	5
4. <u>Espermatogénesis</u>	6
a. Espermatocitogénesis	6
b. Espermiogénesis	7
5. <u>Control hormonal de la espermatogénesis</u>	8
B. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MACHOS	9
1. <u>Entrenamiento del macho</u>	10
2. <u>Recogida del semen</u>	11
a. Recolección de semen con ayuda de la vagina artificial	11
b. Recolección de semen por estímulo eléctrico	13
C. EVALUACIÓN DEL SEMEN FRESCO	14
1. <u>Macroscópicas</u>	14
a. Volumen	14
b. Color	14
c. Densidad	14
d. pH	15
2. <u>Microscópicas</u>	15
a. Motilidad individual	15
b. Vigor	16
c. Concentración	16
D. DILUYENTES DE SEMEN	16
1. <u>Diluyentes naturales</u>	17
2. <u>Diluyentes sintéticos</u>	17
a. AndroMed®	18
(1) Contenido	18

(3) Preparación del diluyente final	18
(4) Recomendaciones	18
(5) Predilución y análisis de semen	19
(6) Congelación de pajuelas	19
b. Triladyl®	19
(1). Composición	20
(2). Preparación del diluyente	20
(3). Recomendaciones	21
c. Ovixcell	21
(1). Composición	21
(2). Características técnicas	22
E. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE SEMEN	22
1. <u>Criopreservación</u>	22
a. Diluyentes	23
b. Agentes crioprotectores	24
2. <u>Vitrificación</u>	24
a. Antecedentes de la vitrificación	25
b. Tipos de vitrificación	26
(1). Vitrificación clásica	26
(2). Vitrificación ultrarápida	27
c. Factores que intervienen en el proceso de vitrificación	27
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	29
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	29
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	29
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	29
1. <u>Materiales</u>	30
2. <u>Equipos</u>	30
3. <u>Instalaciones</u>	31
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	31
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	32
1. <u>Evaluación de eyaculados</u>	32
a. Características macroscópicas	32
b. Características microscópicas	32
2. <u>Evaluación de dosis seminales criopreservadas</u>	33
3. <u>Evaluación económica</u>	33
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	33
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	34
1. <u>De campo</u>	34
a. Selección de carneros	34
b. Preparación de la vagina artificial	34
c. Extracción y manejo del semen	35
2. <u>De laboratorio</u>	35
a. Exámenes macroscópicos y microscópicos	35
b. Preparación de diluyentes	36

(1). Andromed	36
(2). Triladyl	36
(3). OVIXcell	38
c. Crioconservación	38
(1). Congelamiento lento	38
(2). Vitricación	39
(3). Descongelación de pajuelas	39
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	39
1. <u>Concentración</u>	39
2. <u>Volumen</u>	40
3. <u>pH</u>	40
4. <u>Motilidad masal</u>	40
5. <u>Motilidad individual</u>	41
6. <u>Vitalidad espermática</u>	41
7. <u>Formas anormales</u>	41
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	42
A. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL EYACULADO DE CARNERO, PARA LA POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN.	42
1. <u>Color y olor</u>	42
2. <u>Volumen del eyaculado</u>	42
3. <u>Potencial hidrógeno</u>	44
4. <u>Concentración espermática</u>	44
5. <u>Motilidad masal e individual</u>	45
6. <u>Formas anormales</u>	45
7. <u>Vitalidad</u>	46
B. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN EL SEMEN CRIOPRESERVADO, FRENTE A LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CONGELACIÓN Y DILUYENTES COMERCIALES.	46
1. <u>Motilidad masal pre criopreservación</u>	46
2. <u>Motilidad individual pre criopreservación</u>	48
3. <u>Vitalidad espermática pre congelación</u>	48
4. <u>Motilidad masal a los 45 días de criopreservación</u>	52
5. <u>Motilidad individual a los 45 días de criopreservación</u>	53
6. <u>Vitalidad espermática a los 45 días de criopreservación</u>	53
7. <u>Motilidad masal a los 90 días de criopreservación</u>	57
8. <u>Motilidad individual a los 90 días de criopreservación</u>	57
9. <u>Vitalidad espermática a los 90 días de criopreservación</u>	61
C. EVALUACIÓN ECONÓMICA EN LA PRODUCCIÓN DE SEMEN DE CARNERO PROCESADO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CRIOPRESERVACIÓN Y USO DE DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES.	61
V. <u>CONCLUSIONES</u>	64
VI. <u>RECOMENDACIONES</u>	65

RESUMEN

En el Centro de Transferencia Genética “REPROGENES”, ubicado en el Km 2^{1/2} vía a Guano, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, se evaluó el efecto de la criopreservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales en un lapso de 120 días de investigación. Al finalizar el experimento, se determinó que las características macroscópicas adecuadas dentro de los rangos permisibles sobresaliendo el volumen que presentó un promedio de $0,96 \pm 0,04$ ml y parámetros microscópicos óptimos, donde se resalta la motilidad masal (99,0%) y concentración que alcanzó una media de $3281,67 \pm 39,04 \times 10^6$ Spz/ml, lo que permitió obtener hasta un promedio de 58 dosis seminales por eyaculado, así mismo al finalizar el periodo de estabilización del semen de carnero en dilución, se determinó diferencia notables en cuanto a la motilidad masal (98,60 %), motilidad individual (4,95 ptos) y vitalidad espermática (97,60 %) al utilizar Triladyl en relación a los demás diluyentes de criopreservación empleados, además se estableció una mayor rentabilidad al emplear Congelamiento Lento y diluyente Triladyl con 2,017 USD, lo que quiere decir que por cada dólar invertido en este procedimiento se obtiene un beneficio neto de 1,017 USD .Por lo que se recomienda utilizar el sistema de criopreservación mediante congelamiento lento y diluyente Triladyl para el semen de carnero, ya que presentó resultados satisfactorios.

ABSTRACT

This research was applied at Center for Gene Transfer "REPROGENES" located at 2^{1/2} via a Guano, canton Riobamba, Chimborazo province; the effect of ram semen cryopreservation was evaluated by nitrification and slow freezing, using different commercial diluents over a period 120 days of investigation. At the end of the experiment it was determined that macroscopic characteristics adequate within allowable ranges excelling volume presented $0,96 \pm 0,04$ ml and optimal microscopic parameters, where the mass motility (99,0%) and highlights averaged concentration of $3281,67 \pm 39,04 \times 10^6$ Spz/ml, which generated an average of 58 semen doses per ejaculate, also at the end of stabilization period ram semen dilution, significant difference was determined in as for mass motility (98,60 %), individual motility (4,95 ptos), and sperm vitality (97,60 %), when using Triladyl in relation to the other thinners cryoconservation employees also increased profitability was established by using Slow freezing and thinner Triladyl whit 2,017 USD, which means that for every dollar invested in this procedure a net profit of 1,017 is obtained. So we recommend using the stem cryoconservation by slow freezing and thinner Triladyl for semen of ram, since it presented satisfactory results.

LISTA DE CUADROS

No.	Pág.
1. CONDICIONES METEOROLÓGICAS EN EL SECTOR “SAN ANTONIO DE LAS ABRAS”, PROVINCIA DE CHIMBORAZO.	29
2. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	32
3. ESQUEMA DEL ADEVA.	33
4. CALIFICACIÓN DE MOVIMIENTO EN MASA.	40
5. CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD INDIVIDUAL.	41
6. EVALUACIÓN SEMINAL DE LOS EYACULADOS DE CARNEROS CORRIEDALE, ANTES DE SER SOMETIDOS A DILUCIÓN PARA SU POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN.	43
7. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE SEMEN HETEROSPÉRMICO DE CARNERO, SOMETIDO A CRIOPRESERVACIÓN MEDIANTE VITRIFICACIÓN Y CONGELAMIENTO LENTO, UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES.	47
8. ANÁLISIS ECONÓMICO DE LA PRODUCCIÓN DE DÓISIS SEMINALES DE CARNERO, SOMETIDAS A CRIOPRESERVACIÓN MEDIANTE VITRIFICACIÓN Y CONGELAMIENTO LENTO, UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES.	62

LISTA DE GRÁFICOS

No.	Pág.
1. Motilidad masal del semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	49
2. Motilidad individual del semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	50
3. Vitalidad espermática en el semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	51
4. Motilidad masal del semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	54
5. Motilidad individual del semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	55
6. Vitalidad espermática en el semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	56
7. Motilidad masal del semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	58
8. Motilidad individual del semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	59
9. Vitalidad espermática en el semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.	60

LISTA DE ANEXOS

1. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, antes de ser sometido a criopreservación mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.
2. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, a los 45 días de criopreservación luego de ser sometido a vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.
3. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, a los 45 días de criopreservación luego de ser sometido a vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

I. INTRODUCCIÓN

La ovejería en el país ha sido desarrollada de una manera empírica por pequeños productores, quienes han visto en esta actividad un medio de subsistencia, sin embargo con la implementación de buenas prácticas pecuarias (alimentación, sanidad, bioseguridad, manejo y mejoramiento genético), la producción ovina en el país se presenta como una alternativa interesante del sector pecuario, ya que contribuye a satisfacer las necesidades proteicas en la alimentación de población humana y mejorar las condiciones del suelo de cultivo del sector rural, logrando así mantener un equilibrio sustentable a través de los tiempos combinando los aspectos económico, social y ecológico.

Una de las alternativas para incrementar los niveles de la producción ovina, lo constituye el mejoramiento genético, donde la selección de carneros es fundamental dentro de los programas de inseminación artificial lo que implica la maximización de la capacidad reproductiva de los carneros como reproductores élites y que han demostrado ampliamente un gran aporte al mejoramiento genético del ganado ovino tanto productor de lana como productor de carne.

Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes, al mismo tiempo su conservación por periodos más prolongados de tiempo, es así que el uso de semen congelado ovino ha producido un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al permitir acelerar considerablemente el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas, así como al facilitar el transporte de semen a nivel mundial. (Fierro, S. 2005).

Aparte de los criterios genéticos existen otros factores que se deben considerar al seleccionar los machos donadores para los programas de inseminación artificial, entre los cuales encontramos el estado de salud, buen estado de carnes, patrón fenotípico, tamaño y forma de los testículos y epidídimo, vigor sexual, además es importante que el macho seleccionado posea semen de buena calidad y en cantidad, siendo uno de los factores de mayor importancia antes de calificarlo como donador (Janett, F. et al. 2005).

El propósito de la presente investigación fue obtener semen criopreservado de calidad, con buenas condiciones sanitarias para asegurar el progreso genético de las manadas de la zona central del país que tiene como prioridad el mejoramiento de las características de cantidad y calidad de la lana, leche y/o carne, lo que es posible a través de la evaluación de los procesos de congelamiento lento y vitrificación a más de comparar la eficiencia de los diluyentes comerciales disponibles en nuestro medio para el efecto.

Por lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Valorar las características espermáticas de semen de carneros Corriedale, precedente a la crioconservación.
- Evaluar las características espermáticas en el semen de ovino sometido a criopreservación mediante los sistemas de vitrificación y congelamiento lento, con la utilización de diferentes diluyentes comerciales.
- Realizar el análisis económico y evaluar la rentabilidad a través del indicador beneficio - costo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR

1. Aparato genital del macho

Está formado por los testículos, epidídimo, conductos deferentes, glándulas anexas, uretra y pene.

a. Testículos

Para Cueto, M. y Gibbons, A. (2005), los testículos están alojados en el escroto, compuesta por una bolsa de piel delgada y elástica, que además de albergar y preservar los testes permite mantenerlos entre 4°C y 7°C por debajo de la temperatura interna corporal, condición necesaria para la cual se efectúe una correcta espermatogénesis (conjunto de procesos que llevan a la producción de espermatozoides). Los testículos están constituidos por túbulos seminíferos donde se originan los espermatozoides. Todos los túbulos seminíferos desembocan en un conjunto de túbulos llamado rete testis que convergen en el epidídimo.

b. Epidídimo

El epidídimo es un órgano tubular que se encuentra adjunto al testículo y se fracciona en las siguientes partes: Cabeza, cuerpo y cola, tiene como función la de madurar y almacenar espermatozoides. La maduración consiste en la adquisición de motilidad (movimiento) y la capacidad de fertilización, esto se genera en la cabeza y cuerpo, mientras que en la cola se acumulan las células maduras. Cueto, M. y Gibbons, A. (2005)

c. Conductos deferentes

Hafez, E. y Hafez, B. (2002), indican que los conductos deferentes trasladan los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la porción pelviana de la

uretra. Al término de su recorrido tiene una dilatación llamada ampolla, la cual sirve como reservorio espermático sobre todo en animales rumiantes.

d. Glándulas anexas

Las glándulas anexas son aquellas que producen secreciones que dan formación al plasma seminal. En la parte superior dorsal de la vejiga se encuentran dos vesículas seminales situadas a cada lado. Las glándulas bulbouretrales o de Cowper se encuentran ubicadas sobre la región caudal de la uretra, a las que se acopla mediante un pequeño conducto. El plasma producido por estas glándulas alimenta a los espermatozoides, limpia la uretra antes de la eyaculación y esto conlleva a la lubricación del pene y así facilita el coito. La función de estas glándulas va a depender de la secreción de testosterona por los testículos (Gómez, M. 2010).

e. Pene

En la parte central del pene se encuentra la uretra, esta es, básicamente, el conducto excretor de la orina que va desde el cuello de la vejiga hasta el meato urinario externo. El pene, de tejido fibro-elástico, tiene una flexura sigmoidea, la cual le permite extenderse durante la cópula, esta flexura se encuentra en forma de “S”, es fijo; se mantiene en posición por obra del músculo retractor del pene, lo cual al relajarse permite la exteriorización del pene durante la cópula. En el extremo libre del glande se puede observar una extensión de la uretra de 3 a 4 cm que toma el nombre de prolongación uretral o apéndice vermiforme, que gira rápidamente durante la eyaculación para esparcir el semen en la parte interior de la vagina a modo de un aspersor. (Cueto, M. y Gibbons, A. 2005).

f. Prepucio

Según Mejía, A. (2003), la parte de la piel del pene se denomina prepucio, es fina y desplazable, que se repliega y envuelve la porción proximal del glande, formando una capucha, tiene pelos, que en el caso de los machos reproductores es mejor excluirlos.

El prepucio es una invaginación de la piel que contiene y reviste la porción libre del pene cuando no se encuentra en erección.

2. Eyaculación

Melling, M. (2000), manifiesta que la eyaculación empieza con la aparición del libido o deseo sexual en el carnero de lo cual el responsable es la testosterona, en condiciones de apareamiento natural el carnero busca ovejas en celo, apercibe su vulva y de inmediato empuja contra la grupa de estas. Antes de la monta se observa que el macho derrama líquidos a través de la vaina, el pene se mantiene adentro de la vaina hasta que el animal realice la monta, entonces se da la extensión del mismo, el movimiento de propulsión o más conocido como golpe de riñón, seguido de la eyaculación y desmonta.

Gillan, L. et al., (2004), aducen que el semen eyaculado por el reproductor está constituido por la mezcla de los espermatozoides con las secreciones de las glándulas anexas, el volumen promedio por eyaculado es de 1 ml y depende mucho la edad del animal.

3. Ritmos anuales de reproducción del macho

Gillan, L. et al., (2004), explican que el reproductor muestra variaciones estacionales en la producción espermática y en su actividad sexual, la aptitud y capacidad seminal copulatoria del carnero su mayor producción se da en otoño y se encuentra correlacionado con altos niveles de testosterona y LH en la sangre. Existen significativas variaciones acorde a la raza y a la zona en la que se encuentren, como por ejemplo la raza de ovinos Hampshire Down es más estacional a diferencia de la raza Merino que tiene una temporada más extensa en la reproducción.

También una misma raza puede variar su temporada de reproducción y esto va acorde a su sitio geográfico, a mayor latitud es menor la temporada reproductiva. A esto se le nombra efecto del fotoperiodo. En razas de las zonas cálidas o tropicales no se manifiesta este fenómeno, pero si una influencia de la nutrición y

las interrelaciones entre machos y las hembras. Las temperaturas promedio elevadas (mayor a 27°C) pueden reducir la calidad del semen, ocasionando una tasa baja de fertilidad, (Gillan, L. et al. 2004).

4. Espermatogénesis

Las espermiogonias se originan de las células sexuales primitivas, estas se convierten en células sexuales maduras por divisiones continuas en el comienzo de la madurez sexual. (Terranova, E. 2001).

La espermatogénesis se divide en dos fases. La primera es la espermatocitogénesis, en la que ocurre una serie de particiones en las cuales la espermatogonia forma las espermatídes. La segunda es la espermatogénesis, esta es la fase en las cuales las espermatídes sufren transformaciones para formar al espermatozoide. El proceso completo se desarrolla aproximadamente en 7 semanas o que es lo mismo en 49 días. Conforme se va desarrollando la espermatogénesis, los gametos en evolución van desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen, (Gillan, L. et al. 2004).

a. Espermatocitogénesis

Los túbulos seminíferos tienen dos tipos de células. Las primeras llamadas células de Sertoli, son grandes, las cuales sirven como células nutricionales. Los espermatogonios son las células más pequeñas pero son más numerosas, y se les denomina gametos primitivos. Los espermatocitos de primer orden, son diploides, o sea, tienen completos sus cromosomas, como las células somáticas. (Terranova, E. 2001).

Durante la siguiente mitosis que es denominada de reducción se separan nuevamente los pares de cromosomas, emigrando cada uno de los que forman dichos pares hacia los polos del huso. Estos no se dividen en cromosomas hijos, sino que los paternos se distancian de los homólogos maternos y cada uno de estos dos grupos se intercambia en una célula hija, uno con el cromosoma X y el otro con el cromosoma Y. Con ello se ha simplificado a la mitad el número de

cromosomas. El resultado de esta división son células hijas haploides (espermátocitos de segundo orden). La segunda partición de maduración es la mitosis ecuacional. De cada espermátocito de primer orden se derivan, por tanto, cuatro células haploides (espermátidas). Estas células conservan aun el carácter normal como tales. (Gillan, L. et al. 2004).

b. Espermiogénesis

Terranova, E. (2001), manifiesta que en esta fase las espermátidas se conectan a las células de Sertoli. Cada espermátogonio sufre un cambio en la morfología formando un espermatozoide. Durante este cambio, el material nuclear se torna denso en una parte de la célula formando la cabeza del espermatozoide, el centrosoma es parte del segmento central y el protoplasma da lugar a la cola.

El acrosoma es un manto alrededor de la cabeza del espermatozoide y este se formará a partir del aparato de Golgi de la espermátide, el citoplasma de la espermátide se pierde durante la formación de la cola. El espermatozoide recién formado se separará de la célula de Sertoli y será forzado a salir a través del lumen de los túbulos seminíferos hacia la red de testis. Los espermatozoides son células que no poseen citoplasma, y posteriormente de su maduración tienen la capacidad de ser gradualmente más móviles. La espermatogénesis se completa entre los 15 a 17 días. (Hafez, E. y Hafez, B. 2002).

El mismo autor, opina que los espermatozoides maduros son células prolongadas consistentes, con una cabeza extenuada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. La hormona folículo estimulante es ineludible para la espermatogénesis, mientras que la hormona luteinizante incita a las células intersticiales del testículo para que segreguen testosterona. Como consecuencia de la espermatogénesis surgirán dos espermatozoides genéticamente diferentes, unos transportarán el cromosoma X y otros llevarán cromosomas Y, lo que constituyen la base de la determinación del sexo.

Para Aguilar, E. (2005), estos logran luego su capacidad de fecundación en el

epidídimo, donde permanecen almacenados. En cada túbulo la acción espermatogénica puede cambiar en momentos a lo largo de su longitud. El epitelio seminal es muy sensible a los predominios tóxicos, la espermatogénesis finaliza inmediatamente cuando se expone a malas condiciones.

Durante la espermatogénesis cada uno de los espermatozoides despiden una gota de protoplasma que sirve para beneficiar la unión de la cabeza y el cuerpo del espermatozoide.

Cuando los espermatozoides traspasan el epidídimo se alimentan de sus secreciones y consiguen una cubierta lipídica protectora. Su acción se incrementa lentamente y su fertilidad progresa a medida que se alejan del testículo, la cola del epidídimo es el sitio principal para la supervivencia y almacenamiento de los espermatozoides.

El tiempo que tardan los espermatozoides en cruzar el epidídimo varía de 4 a 12 días y su vida media efectiva es de poco más o menos 40 días. Las contracciones peristálticas del epidídimo son las principales responsables del movimiento de los espermatozoides a través de él. Las funciones secretoras y motoras del epidídimo dependen de la testosterona, pero la oxitocina también puede intervenir sobre la motilidad del sistema conductor eferente. (Aguilar, E. 2005).

5. Control hormonal de la espermatogénesis

Nabiev, D. et al., (2003), sugieren la función de la LH en la regulación de la espermatogénesis es en forma indirecta, ya que ésta incita la liberación de testosterona, la testosterona 6,70 mg/dl y la FSH actúan en los túbulos seminíferos estimulando la espermatogénesis. La testosterona es necesaria en ciertas etapas de la espermatogénesis, y es más arbitrario en la regulación de estos procesos.

La FSH es más imperioso en la norma de la espermiogénesis, tanto la testosterona como la hormona FSH hacen una influencia directa a través de las

células germinales, indirecto a través de las células de Sertoli. La FSH provoca a las células de Sertoli para que secreten a la proteína andrógena de fijación (PAF) y la inhibina. La (PAF) es simplemente un transportador para la testosterona, facilitando su recurso durante la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y trasladándole a través de la red de testis hacia el epidídimo. La (PAF) se atrae y es absorbida en el epidídimo, (Gómez, M. 2010).

Los controles de retroalimentación que maniobran entre los testículos, hipotálamo e hipófisis anterior en la regulación de la liberación de gonadotropinas (FSH y LH) y esteroides gonadales (testosterona). La (PG2 α) estimula la liberación de LH y de testosterona. (Aguilar, E. 2005).

B. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MACHOS

Herold, F. et al, (2002), mencionan que para una elección de los machos se deberán inspeccionar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testes y epidídimo, órganos los cuales pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y flexibles, que carezcan lesiones y deformidades al moverse libremente dentro del saco escrotal. La cola del epidídimo se debe manipular con destreza y tener igual tamaño y forma en ambos testículos. Si alguna parte del epidídimo se encuentra fortalecida o prolongada se debe sospechar la existencia de epidimitis.

De igual manera se debe poner atención a la integridad del conducto deferente, en el cuello del escroto, debe estar rígido y fácilmente palpable. Finalmente, se deben examinar las posibles anormalidades en prepucio, pene y, especialmente, en el proceso uretral, que puede lesionarse con mucha facilidad al expulsarse algún calculo urinario. Los animales con defectos, como criptorquidismo, hipoplasia testicular, espermiostasis o variocelos (dilatación de la vena espermática) deben ser definitivamente excluirlos de los programas de inseminación. (Herold, F. et al, 2002).

Para Janett, F. et al., (2005), este es un tema que a menudo se olvida al seleccionar los sementales es la capacidad de servicio y su vigor sexual que

puede tener los animales, que se obtiene al controlar mediante una prueba de servicio, en la que el reproductor se expone a una serie de hembras en estro.

La falta del vigor en los machos al montarlas puede que se deba a un trauma físico, probablemente como causa de artritis, mal de pezuñas o laceraciones en el pene. Por otro lado, los machos posponen en cuanto a su temperamento y conducta sexual, lo que, sin duda, afecta a su capacidad de servicio.

Es importante que el macho seleccionado tenga semen de buena calidad y en cantidad. Este factor se debe examinar inmediatamente antes de comenzar el programa de inseminación artificial, aun cuando se haya vigilado anteriormente, por ejemplo, antes de comprarlo (Janett, F. et al. 2005).

1. Entrenamiento del macho

Salamón, S. y Maxwell, W. (2000), manifiestan que el método aconsejable es el de recoger el semen mediante la vagina artificial. Los animales, seleccionados, deben de ser entrenados para que puedan eyacular dentro de la vagina artificial, comenzando un mes antes del inicio del programa de inseminación artificial. Con esto permitimos un amplio margen para el entrenamiento, con esto aseguramos una buena calidad del semen y, quizás, se pueden substituir los sementales que no satisfagan nuestras necesidades. El entrenamiento es mejor hacerlo durante la estación reproductora, cuando el deseo sexual es más notorio y cuando se dispone de hembras en estro que sirven como maniqués.

Una vez entrenados los carneros a eyacular, en la vagina artificial, los machos aprenden rápidamente cuando son requeridos en el futuro para recolectar semen de nuevo, el entrenamiento consiste en desarrollar y reforzar los reflejos condicionados del semental para servir a una hembra, en un sitio cerrado y en presencia de dos personas. Al mismo tiempo estas personas alcanzaran a familiarizarse con el temperamento y conducta de los sementales.

Salamón, S. y Maxwell, W. (2000), describen que a menudo la acumulada de semen se suele hacer en el cobertizo de esquila, aunque en cualquier lugar

cubierto se puede realizar. El cobertizo debe tener espacio suficiente y lugar para instalar la hembra maniquí y que el personal pueda desenvolverse adecuadamente. La visión así como el olfato, son muy trascendentales en el estímulo sexual, con lo que es importante que el entrenamiento de los reproductores se haga de tal forma que puedan ver a la hembra e incluso que vean como la montan otros reproductores.

Para las intenciones del entrenamiento se necesita una hembra en celo, que puede ser cualquiera de las señaladas por los machos recelas en el rebaño o que presente celo sincronizado. Sucesivamente, el estro se puede influir en hembras inyectándolas por vía intramuscular de 50 mg de benzoato de estradiol 1-2 ml de aceite de cacahuete. Las hembras asistidas expresarán síntomas de estro a los 1-2 días, pero el tratamiento no debe ser mayor de 5 días. Una vez los carneros y reproductores cabríos estén entrenados, las hembras maniquís no necesariamente deben estar en estro, ya que los machos están condicionados a montar a cualquier hembra que este ubicada en el aparato sujetador del cobertizo. Es recomendable seleccionar hembras maniquís dóciles, ya que los machos pueden despistarse por aquellas hembras que no se estén completamente quietas. (Batellier, F. et al., 2001).

2. Recogida del semen

a. Recolección del esperma con ayuda de la vagina artificial

Batellier, F. et al., (2001), exponen que la vagina artificial es una copia de la vagina de la oveja, que proporciona el estímulo térmico y mecánico para la erección del pene del reproductor y que son, equivalentemente, necesarios para producir la eyaculación.

La vagina artificial manipulada para carneros es similar a la usada para bovinos, esta consiste en una caperuza externa (de 20 x 5,5 cm para el macho y 15 x 5,5 cm. para el reproductor cabrío) elaborada con goma fuerte, plástico u otro material sintético que tenga propiedades aislantes, un conducto interno elaborado de goma o material sintético adecuado. El tamaño de la vagina artificial está en

relación con la prolongación del pene, el del reproductor cabrío es más corto. El conducto interno suele tener unos 2-3 cm más que la capucha externa con el fin de poderse plegar sobre ésta, paralizándola con sendas de bandas de goma, para formar una especie de depósito para el agua. (Batellier, F. et al., 2001).

Para Bedford, S. et al., (1995), la vagina debe estar limpia, seca y estéril, una misma vagina, sin limpiar, no se debe manipular para diferentes recogidas de semen. Después de cada uso se debe higienizar, enjuagarse con agua destilada y secarla profundamente; si se pasa, por el interior, una delgada película de alcohol al 70% en agua bidestilada, se secará, luego, a continuación se satura la mitad del depósito con agua a 48-50°, a través del tampón colocado en el lateral y con la ayuda de un embudo o jeringuilla de 100 ml (el calor del agua contribuirá a evaporar el alcohol). Si se satura demasiado de agua, se saldrá, cuando se deje la vagina en posición vertical. Impedir, en todo momento, que el agua ingrese en el tubo interno ya que puede ser la causa de aniquilación de los espermatozoides.

Salamón, S. et al., (2000), manifiestan que uno de los extremos del conducto interno se debe engrasar ligeramente con brillantina, en una extensión de no más de 3 cm manipulando una varilla de plástico o de vidrio. En el otro extremo se debe colocar el tubo de vidrio estéril y calibrado, para recoger el semen, incrustándolo 1,5-2,0 cm mientras se coloca el tubo se debe inflar aire, por el extremo accesible, y luego se cierra, todo ello con el fin de que el tubo quede perfectamente conectado. La sopladura debe ser de tal magnitud que haga presión pero a la vez, permita una fácil penetración del pene. La presión óptima para algunos machos solo puede conocerse a través de la experiencia.

Según Rota, A. (2004), manifiesta que la temperatura de la vagina artificial, inmediatamente antes de coger el semen, debe ser de 42-45 °C, lo que se puede controlar mediante la introducción de un termómetro limpio. Si la vagina se encuentra con un exagerado frío, se debe llenar con agua más caliente, que la que se utilizó con anterioridad. Con el objetivo de evitar el shock térmico, de los espermatozoides, los vidrios de recogida deben estar calientes a 30-37 °C. En los climas que sean de bajas temperaturas, donde sea difícil mantener la temperatura

de la vagina a 42-45°C, puede calentarse, durante un tiempo corto, en una estufa de cultivo a 37 ° C antes de aumentar al agua.

Los movimientos potentes hacia arriba y hacia delante significan que se ha producido la eyaculación. Se debe dejar que el reproductor retire el miembro viril de la vagina antes de intentar retirar ese dispositivo.

Inmediatamente después de la recogida la vagina artificial se cambia de posición, quedando el caño de vidrio en la parte inferior, a la vez que se sujeta este con la mano. Se quita la presión al abrir la válvula, teniendo la cautela de que no salpique agua cerca del caño de recogida de semen. Luego se quita el polvo, se etiqueta, se corcha y se coloca en un baño a 30 °C. (Rota, A. 2004).

b. Recolección de semen por electroeyaculador

Sztein, A. et al., (2001), muestran que existen varios tipos de estimuladores eléctricos, los más conocidos son los que tienen un electrodo bipolar para el recto. El aparato usualmente utilizado, en Australia y Nueva Zelanda, es el Ruakura Ram Probe. Se trata de un estimulador accionado por baterías que proporciona una salida de 10 ó 15 voltios, cuando el recto del macho está seco se recomienda utilizar los 15 voltios; prácticamente se ha utilizado estimuladores más automáticos.

El pene se debe extender por enderezamiento de la flexura sigmoidea de tal forma que el glande del pene se pueda sujetar con la mano, limpia, y liberar el pene del prepucio. Por atrás del glande se coloca un pedazo de gasa y se introduce el glande y el proceso uretral en un tubo de ensayo. Lo más idóneo es sujetar el pene y el tubo de ensayo con la misma mano dejando la otra libre para dar masaje en el pene en dirección hacia delante entre para cada estímulo eléctrico. (Sztein, A. et al., 2001).

Al respecto Salomón, S. et al., (2000), opinan que un asistente debe presionar sobre la sonda con dirección hacia el suelo de la pelvis, aplicándose luego cortos estímulos (3-8 segundos) a intervalos de 15-20 segundos. Después de unos

cuantos estímulos la secreción de las glándulas accesorias fluirán y enseguida el semen. Cuando se obtenga primeramente grandes cantidades de líquido claro, se deben rechazar para evitar diluciones innecesarias del semen.

C. EVALUACIÓN DEL SEMEN FRESCO

1. Macroscópicas

a. Volumen

Gómez, M. (2010), expone que ha examinado directamente sobre el tubo graduado aduce que un macho mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menor a 1,2 ml con una diferenciación del volumen entre 0,8 y 1, 5 ml.

b. Color

Al respecto Gómez, M. (2010), considera uniformes los colores que van del blanco al amarillento, siendo anormales, los colores rosado, amarronado y verdoso.

Pezzone, N. (2008), señala que la coloración amarillenta se debe a la riboflavina repudiada por las glándulas vesiculares y ampollas del conducto deferente, no teniendo ningún tipo de trascendencia clínica.

c. Densidad

Gómez, M. (2010), describe que la densidad del semen va desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración.

Hafez, E. (1990), manifiesta que existe relación entre viscosidad y concentración de espermatozoides. Cuando la densidad es normal, el semen tiene aspecto similar al de la crema de leche.

d. pH

Gómez, M. (2010), dice que se debe valorar extrayendo una fracción de semen del tubo y luego colocar sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, cuando se encuentra en el rango entre 6.2 y 6.8.

2. Microscópicas

a. Motilidad individual

Gómez, M. (2010), señala que para realizar esta evaluación se debe disolver el semen en Citrato de Na al 2.92% para este proceso se coloca una gota gruesa de semen alrededor de 30 ó 40 microlitros en un tubo con unos 2 ml aproximadamente de la solución de Citrato la cual debe estar a la misma temperatura del semen, una vez disuelto el semen se extrae una gota de la dilución y se la coloca sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C colocándola en un cubreobjetos, a la misma temperatura.

Aisen, E. (2004), menciona que para mirar al microscopio, siempre debe realizarse sobre la platina térmica a 37 grados °C y a 400 aumentos. Se debe observar un campo y apreciar subjetivamente los espermatozoides que se movilizan en forma rectilínea progresivamente, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o van avanzando en forma oscilatoria, se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se indica son aquellos espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides aceptados, siendo el valor mínimo aceptable para la inseminación del 50 %. Para la evaluación de la motilidad individual pueden valerse de distintos métodos prácticos; uno de ellos es el siguiente:

- Muy buena: 80 – 100 % de células móviles.
- Buena: 60 – 79 % de células móviles.
- Regular: 40 – 59 % de células móviles.
- Mala: < 40 % de células móviles.

b. Vigor

Según Gómez, M. (2010), se evalúa el vigor, al igual que la motilidad individual, teniendo mucho en cuenta la velocidad con la que los espermatozoides atraviesan el campo. La escala utilizada es de 0 a 4, valorando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 4 los que van avanzando rápidamente por el campo y es muy complicado seguirles visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable de 3.

c. Concentración

Respecto a la concentración Rota, A. (2004), aduce que para valorar la concentración, se debe preparar anticipadamente una solución salina formulada al 2%. Se ponen 10 microlitros de semen puro en 2 ml de solución salina formulada (1/200) y se homogeniza volteando el tubo varias veces. Una vez homogenizado, se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la Cámara de Newbawer por capilaridad, en ambos retículos, teniendo en cuenta de cargar otros 14 microlitros para el segundo retículo volvemos a homogenizar entre una carga y otra.

D. DILUYENTES DE SEMEN

Merino, R. (2003), indica que los disolventes son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el declive del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el desnivel osmótico al que estará sometido será menor.

Laing, J. et al., (1990), mencionan que los diluyentes tienen dos funciones básicas; el mantenimiento de la fertilidad durante la crioconservación y la dilución del eyaculado para alcanzar el número apropiado de espermatozoides por dosis inseminante.

Ilera, M. (1994), expone que los disolventes del semen deben contener: un

sustrato energético (azúcar), una concentración apropiada de electrolitos para proteger a los espermatozoides de los cambios de pH y presión osmótica (solución tampón), 25 componentes de alto peso molecular para preservar a las células de los efectos nocivos del frío y garantizar las membranas durante la congelación (lecitina, proteínas, lipoproteínas), un agente crioprotector (glicerol) y antibióticos.

1. Diluyentes naturales

Salamón, S. (2000), opina que en ambientes de campo el diluyente del semen más fácilmente aceptable es la leche del bovino, que se puede utilizar tanto entera, como descremada o en polvo para reestablecer, siempre que se vaya a proceder a la inseminación artificial cervical o vaginal. En algunas partes también se utiliza leche UHT esto quiere decir que es tratada a temperaturas demasiadas altas, que tiene la propiedad de conservarse mejor.

Si se utiliza leche entera, descremada o en polvo se debe calentar a 92-95 °C, en baño de agua María, durante 8-10 minutos, para inactivar los factores tóxicos de su función proteica. (Laing, J. et al., (1990).

2. Diluyentes sintéticos

Fernández, D. (2001), señala que los disolventes sintéticos se utilizan comúnmente para diluir semen de carnero, para inseminación artificial ya sea vaginal o cervical, contienen como amortiguador el tris o citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo para proteger a la membrana del espermatozoide contra el shock por frío.

Según Fierro, S. (2005), aduce que estos diluyentes también son utilizados para el semen del macho cabrío, aunque en una cantidad menor de yema de huevo, con esto se evita que se ponga de manifiesto una reacción enzimática, como consecuencia de que se coagula la yema de huevo.

a. AndroMed®

Según Müller, F. (2005), cada año, desde que AndroMed® fue incrustado por primera vez en el año 2000, el número de pajuelas de semen producidas con AndroMed® se ha aumentado mundialmente en 60 a 100%. Este diluyente se ha convertido en un verdadero estándar de laboratorio dentro de la producción moderna de semen, con más de 100 millones de dosis de semen procesados cada año.

(1). Contenido

Nabiev, D, et al., (2003), aducen que AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua bidestilada y antibióticos.

(2). Colección de semen

Para Nabiev, D. et al., (2003), la temperatura interna de la vagina artificial no debe exceder a los 43°C al momento de la colección del semen, a fin de evitar daños al semen por calor excesivo.

(3). Preparación del diluyente final

Nabiev, D. et al., (2003), mencionan que el contenido (200 ml) de un frasco de AndroMed® debe diluirse con 800 ml de agua bidestilada, previamente temperada a 30°C hasta 35°C, es viable preparar volúmenes menores siempre y cuando se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado.

(4). Recomendaciones

Nabiev. D, et al., (2003), señalan que para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua bidestilada debe agregarse al concentrado y no inversamente. El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre 30°C y 32°C.

(5). Predilución y análisis de semen

Nabiev, D. et al., (2003), dicen que seguidamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debería ser evaluado tanto concentración como motilidad y entonces prediluido 1+1. El eyaculado debiera mantenerse en el baño-maría entre 30°C y 32°C. Al momento de la dilución, el disolvente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). El semen no debe permanecer en el baño-maría por más de 10 minutos. Una vez realizada la evaluación se debe efectuarse la dilución final.

El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (20°C a 23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas. En forma alternativa, AndroMed® puede manipularse para el envasado de las pajuelas a +5°C. Para ello, el semen diluido debe ser equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C.

(6). Congelación de pajuelas

Nabiev, D. et al., (2003), reportan que la congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120°C.

El proceso de congelación en un congelador automático debe extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas (0,25 ml) y 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml).

b. Triladyl®

1. Triladyl® es un condensado estéril para la preparación de un disolvente con yema de huevo para la congelación de semen ovino en un solo paso. Triladyl® se facilita también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo bovino, caprino, ciervo y muchas otras especies. (Minitube, www.minitube-international.com, 2003).

(1). Composición

Nabiev. D, et al., (2003), indican que este diluyente es elaborado en Alemania, por la empresa Minitube; este es un concentrado para la elaboración de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en TRIS (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético), y además contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructuosa, y por cada 100 ml contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomicina 15 mg. Para la debida preparación se adiciona tres partes de agua destilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial Triladyl® (20%). (Minitube, 2003).

(2). Preparación del diluyente

El diluyente listo se dispone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de concentrado de Triladyl® (250 g) en un matraz graduado, y agregando en diversos pasos 750 ml de agua pura estéril. Esta solución madre es seguro y puede mantenerse a +5°C por alrededor de una semana. (Minitube, 2003).

Para completar el diluyente, deben añadirse a la solución madre 250 ml de yema de huevo fresca. Es posible pesar 250 g de yema de huevo, por cuánto el volumen y peso son semejantes. Se puede realizar la esterilización de la cáscara del huevo pasándolo por una llama. Posteriormente se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, derramando la yema, sin romperla, de una a otra mitad de la cáscara. Para independizar completamente la yema de la clara, se colocan una por una sobre papel de filtro, haciéndolas girar sobre el papel, que retiene los restos. Por último, la yema de huevo se posiciona en el borde del papel filtro, se envuelve en el papel y se presiona para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando fijada la membrana al papel. (Minitube, 2003).

Enseguida, se le agrega a la yema paulatinamente la solución madre, fusionándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio. La observación estricta de este orden es de gran importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl® (agregar la solución madre a la yema, no al contrario), para terminar, el disolvente preparado debe filtrarse a través de un filtro-embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su uso. (Minitube, 2003).

(3). Recomendaciones

Después de colectar el semen, el eyaculado es mantenido en un baño maría entre 28°C y 30°C. Una vez valorado mediante examen macroscópico y microscópico, se prediluye el semen 1:1 en el mismo vaso colector, dejando escurrir lentamente el diluyente a lo largo de la pared del vaso. Una vez calculada la dilución final, el semen prediluido es dispersado cuidadosamente, a lo largo de su pared, a un envase temperado de mayor tamaño, adicionando a continuación el volumen de diluyente aún requerido. Es conveniente batir el envase durante la dilución, para lograr una adecuada mezcla del semen con el diluyente. (Minitube, 2003).

c. Ovixcell

Este es un medio listo para usar, sin yema de huevo, reemplazado por un complejo de fosfolípido, el semen puede fecundar a las 24 horas de conservación a 4 ° C, los costos laborales y de envío reducidos, en tanto que la preservación del semen se puede hacer con éxito, este es utilizado también en caprino sensible a la yema de huevo. (National Agricultural Research Foundation.Grecia, 2013) IMV y el NAGREF.

(1). Composición

Nabiev. D, et al., (2003), expresan que este diluyente es fabricado en EEUU, por la empresa IMV Technologies; es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está compuesto por Agua, Sal, Azúcar, Electrolitos, Glycerol, Antibióticos y Proteína animal.

(2). Características técnicas

El Ovixcell, está listo para usar, y ser mezclado directamente con el semen ovino, su color es marrón claro y es esterilizado por irradiación.

(3). Preparación

Llevar Ovixcell, a 34 a 37 °C en Baño María, para luego añadir el eyaculado recolectado fresco a una taza de dilución de acuerdo al método de congelación, para inseminación artificial se recomienda una concentración mayor a 50 millones por dosis.

E. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE SEMEN

1. Criopreservación

Salamon, S. y Maxwell, W. (2000), alegan que las primeras investigaciones del siglo veinte sobre el acaparamiento de semen se iniciaron en la década de los años cincuenta; ya en esa época se observaba que sólo una proporción de los espermatozoides era capaz de sobrevivir a los procesos de congelación.

La disminución y el aumento de la temperatura que implica la congelación y descongelación, irremediablemente reducen la proporción de espermatozoides móviles y causa daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales.

Watson, P. y Martin, J. (1972), manifiestan la respuesta de los espermatozoides a la congelación varía según la especie, siendo la especie ovina la más susceptible a este proceso, los principales cambios que ocurren durante el almacenamiento incluyen la reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide.

Por otra parte, existe un rango crítico de temperaturas a la que este gameto es especialmente sensible (-10° y - 40° C); además, hay que tomar en consideración que los espermatozoides atraviesan estas temperaturas no sólo en el proceso de congelación, sino también al momento de la descongelación.

Inicialmente, cuando se comenzó a crioconservar semen de un reproductor, se extrapolaron los métodos y los disolventes utilizados en la congelación de semen bovino, pero los resultados no fueron los apropiados, ya que la fertilidad al instante de inseminar ovejas resultó muy baja.

Merino, R. (2003), indica que para una congelación apropiada debe permitir a los espermatozoides mantener en el tiempo su integridad y capacidad funcional además debe permitir a estos gametos atravesar las temperaturas críticas evitando el mínimo daño. Lo anterior expuesto es posible utilizando soluciones que tengan un rol protector.

a. Diluyentes

Salamon, S. y Maxwell, W. (2000), señalan que el plasma seminal sólo concede al espermatozoide una protección limitada contra los cambios bruscos de temperatura.

Los diluyentes utilizados para la preservación de semen de carnero, al igual que las demás especies, deben cumplir con ciertas exigencias, como, contener sustancias que protejan a la célula del daño causado por las bajas temperaturas, proporcionar una fuente de energía (azúcares), poseer capacidad de tampón para prevenir los daños ocasionados por los cambios de pH, mantener la presión osmótica y el balance electrolítico, poseer agentes antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano y por último, aumentar el volumen de las dosis inseminantes.

Watson, P. y Martin, J. (1972), expresan que la mayoría de los diluyentes para la crioconservación del semen ovino son hipertónicos con respecto al plasma seminal, debido a que mueven un menor daño que los isotónicos; esto se explica porque inducen a una mayor deshidratación de la célula y en consecuencia reducen el volumen de agua intracelular que se transformará en hielo al momento de producirse la congelación.

b. Agentes crioprotectores

Las lesiones sobre las estructuras celulares debidas a la crioconservación pueden atenuarse mediante la añadidura de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Muchas sustancias han sido identificadas por su acción crioprotectora y muchas de las cuales han sido utilizadas con espermatozoides.

Celestinos, M. y Gatica, R. (2002), exponen que los crioprotectores pueden clasificarse en dos grupos, los penetrantes, intracelulares o permeables, son aquellos que son sustancias de bajo peso molecular, generalmente están los alcoholes, como el glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, etc. Estos crioprotectores ingresan a la célula de forma uniforme, provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular, evitando así el aumento de la concentración de solutos ya que reemplaza osmóticamente al agua.

El otro grupo son los crioprotectores los no penetrantes, extracelulares o no permeables, que son sustancias de alto peso molecular y generalmente azúcares como la glucosa, fructosa, sucrosa, lactosa, rafinosa, y otros como las lipoproteínas de la yema de huevo. La principal función de estos es extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula además, son capaces de reducir las fuerzas iónicas fuera de la célula e intervienen en la formación de cristales de hielo.

Celestinos, M. y Gatica, R. (2002), alegan que la yema de huevo contiene un componente activo lipoproteico de baja densidad que cubre la totalidad de la superficie del espermatozoide durante la congelación y posteriormente su descongelación, bloqueando la entrada de los iones de calcio a la célula. Preserva a los espermatozoides contra el shock frío (factor de resistencia), además confiere resguardo en la congelación y la descongelación manteniendo la viabilidad espermática o factor de almacenamiento.

2. Vitrificación

Vajta, G. y Kuwayama, M. (1998), exponen que la vitrificación es un asunto físico de solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. Este fenómeno puede ser considerado como un incremento extremo de la viscosidad, que requiere de altas tasas de enfriamiento y calentamiento.

Durante el proceso llamado vitrificación, el semen está sujeto a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento del semen. Esto se debe a medida que desciende la temperatura, se va formando un mayor número de cristales de hielo los cuales provienen de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va creciendo en los espacios que aún no se congelan.

Este fenómeno llamado choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser perjudicial para la sobrevivencia del embrión, esto se debe gracias a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos.

Arav, A. et al., (2000), indican que para tener buenos resultados se deben tomar muy en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración del crioprotector, método de adición, temperatura, tiempo de equilibrio, solidificación, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen debido a que estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector

Zeron, Y. et al., (2000), explican que el máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C esto se debe a la fase de transición de la membrana lipídica. Esta fase se ve perturbada por la fusión de los liposomas afectando el termo comportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel y la celeridad de penetración de los crioprotectores.

a. Antecedentes de la vitrificación

Zhu, S. et al., (1993), exponen que la preeminencia de la vitrificación para la criopreservación de material biológico fue sugerida inicialmente por Luyet en 1937 quien ratificó que la cristalización es incompatible con los sistemas vivos y esta debe ser evitada siempre que sea posible, además, se refirió que era posible la criopreservación de sistemas vivos pequeños a velocidades muy altas de congelación, logrando descartar la formación de hielo y crear en su lugar un estado vítreo o semejante al vidrio. Sin embargo, la vitrificación no fue aceptada en su totalidad como una estrategia práctica para la criopreservación de embriones hasta muchos años más tarde después cuando se catalogó como un método rápido y eficiente para la criopreservación de sistemas biológicos.

Willadsen, S. (1977), reportó una alta sobrevivencia de embriones ovinos enfriados lentamente hasta una temperatura bajo cero relativamente alta (-30 a -40 °C), antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido siendo notable dado que permitió reducir a la mitad, el tiempo requerido por el protocolo original; por lo demás, simplificó y aceleró la técnica de descongelación

b. Tipos de vitrificación

Se puede hablar de dos tipos de vitrificación diferentes. Por un lado está la vitrificación clásica, la cual se utiliza una pajuela de 0,25 ml como dispositivo de almacenamiento, la cual es utilizada en la técnica de congelación lenta. Por otra parte, en la última década se ha prosperado un nuevo concepto de vitrificación empleando el mínimo volumen de solución posible para apresurar la tasa de enfriamiento mediante el empleo de dispositivos apropiados para ello. Este último procedimiento se le conoce como vitrificación ultrarrápida. (Willadsen, S 1977).

(1). Vitrificación clásica

Vajta, G. y Kuwayama, M. (1998), infieren que los primeros experimentos de vitrificación realizados con embriones bovinos, utilizaban el mismo dispositivo de almacenaje que el empleado para la congelación lenta, esto quiere decir, en

pajuelas de plástico de 0,25 ml. Para conseguir las tasas de enfriamiento indispensables para adquirir el estado vítreo, éstas eran introducidas directamente en el nitrógeno líquido. Mediante este proceso se obtenían velocidades de enfriamiento de, aproximadamente, 2.500°C/min. No obstante, las características de estas pajuelas han resultado ser un obstáculo para que el intercambio de temperaturas sea suficientemente rápido. La necesidad de implantar cantidades de solución de vitrificación relativamente altas (>5 µl), las cuales son requeridas para formar una columna estable de medio, y las paredes gruesas de las mismas, actúan como aislante térmico, apartando la muestra biológica de la fuente de frío, o de calor en el caso del calentamiento. Asimismo, los cambios de presión extremos inducidos por la inmersión en el nitrógeno líquido de un sistema cerrado, provocan en muchos casos que aun estando intactas, las pajuelas estallen y se pierda con ello la muestra que se pretende vitrificar.

(2). Vitrificación ultrarápida

Debido a las limitaciones del sistema de vitrificación en pajuelas, iniciaron a desarrollarse dispositivos que beneficiaran el intercambio térmico, incrementándose, tanto las velocidades de enfriamiento como las de calentamiento. En 1996, Martino y cols., narraron un sistema de vitrificación para ovocitos bovinos fundamentado en la utilización de una gradilla de cobre de microscopía electrónica, que consistía en conseguir tasas de enfriamiento superiores a las obtenidas mediante la vitrificación clásica, mejorando de forma significativa la tasa de supervivencia de los ovocitos. (Mukaida, T. et al., 2003).

Vajta, G. y Kuwayama, M. (1998), explican que en consecuencia, comenzó a ilustrarse esta posibilidad, valiéndose de diversos dispositivos que mejoraran las características del anterior. Algunas técnicas se fundamentaban en el contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido mediante la sumersión en el mismo de una gota de medio conteniendo al ovocito/embrión. Este proceso presentaba muchos percances, incluyendo el riesgo de contaminación, que se puede evadir utilizando nitrógeno líquido estéril. Pero el principal problema que había, era que, la cantidad de medio necesaria para la formación de una gota es relativamente grande (5-6 µl) e igualmente, antes de sumergirse la misma en el nitrógeno

líquido, se conserva un corto periodo de tiempo flotando en él, reduciendo formidablemente la tasa de enfriamiento.

c. Factores que intervienen en el proceso de vitrificación

Shaw, J. y Jones, M. (2003), indican que para el proceso de vitrificación se debe considerar una solución base esta es un medio criopreservante acuoso que no se congela al ser refrigerado a altos intervalos de enfriamiento a muy bajas temperaturas, la que es acomodada usualmente como un medio con un pH estable.

Para la vitrificación espermática se recomienda la utilización de buffer TRIS como solución base.

Otro factor de gran relevancia a ser considerado son los agentes crioprotectores. Ya que el enfriamiento a temperaturas bajo cero sin protección, devasta a la mayoría de las células inmediatamente, debido a daños causados por el crecimiento intracelular de cristales de hielo. (Shaw, J y Jones, M. 2003).

Palasz, A. y Mapletoft, R. (1996), describen que existen tres grupos de agentes crioprotectores. El primer grupo conformado por crioprotectores de bajo peso molecular y permeables; entre estos se encuentra el metanol, el etilenglicol, el propilenglicol, el dimetilsulfóxido, el 2,3 butanodiol, el glicerol, y otros alcoholes de su clase.

Un segundo grupo los cuales están conformados por crioprotectores de bajo peso molecular y no permeable como la galactosa, la glucosa, la sacarosa, la trehalosa y otros azúcares.

Palasz, A. y Mapletoft, R. (1996), exponen que el tercer y último grupo está formado por crioprotectores de alto peso molecular y no permeable entre los que se destacan la polivinilpirrolidona, el alcohol polivinílico, el hialuronidato de sodio y distintos polímeros.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo experimental se desarrolló en las instalaciones del Centro de Transferencia Genética “REPROGENES”, ubicado en el sector “San Antonio de las Abras”, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, y tuvo una duración de 120 días.

Las condiciones meteorológicas de la zona se detallan en el (cuadro 1).

Cuadro 1. CONDICIONES METEOROLÓGICAS EN EL SECTOR “SAN ANTONIO DE LAS ABRAS”, PROVINCIA DE CHIMBORAZO.

PARÁMETROS	VALORES MÍNIMO
Temperatura (° C)	13,8
Humedad relativa (%)	63,2
Precipitación anual (mm/año)	465
Heliofanía , horas luz/día	5,5

Fuente: Estación meteorológica de la FRN. ESPOCH. (2014).

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

En la presente investigación las unidades experimentales estuvieron constituidas de 3 dosis seminales heterospérmicas de 0,5 ml criopreservadas en nitrógeno líquido, provenientes de 2 carneros de la raza Corriedale de 2 años de edad, siendo necesarias un total de 180 dosis para el desarrollo del experimento.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

Los materiales, equipos e instalaciones que se emplearon en el desarrollo de la presente investigación se distribuyeron de la siguiente manera:

1. Materiales

- Carneros.
- Viales de plástico de 2,5 ml.
- Tubo de ensayo.
- Porta y cubre objetos.
- Pipetas.
- Pajuelas.
- Pinza.
- Caja de poliestireno.
- Libreta de apuntes.
- Esferográficos.
- Vasos de precipitación.
- Diluyente Andromed.
- Diluyente Triladyl.
- Diluyente OVIXcell.
- Nitrógeno líquido.
- Agua bidestilada.

2. Equipos

- Vagina artificial.
- Microscopio.
- Termo de nitrógeno.
- Baño María.
- Micro pipeta.
- Cámara fotográfica.
- Equipo sanitario.
- Computador.
- Impresora.

3. Instalaciones

La presente investigación se desarrolló en las Instalaciones y Laboratorio del Centro de Trasferencia Genética Reprogenes, ubicado en el sector “San Antonio de las Abras”, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

En la investigación se estudió el efecto de dos factores de estudio; el factor A estuvo constituido de dos tratamientos consistentes en diferentes métodos de criopreservación (Vitrificación y Congelamiento Lento), mientras que en el factor B se consideró la utilización de tres diluyentes comerciales (AndroMed®, Triladyl® y OVIXcell), para la distribución de tratamientos y análisis de resultados se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial con 10 repeticiones, ajustándose al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : Valor estimado de la variable

μ : Media general

α_i : Efecto de los sistemas de criopreservación (A)

β_j : Efecto del tipo de diluyente (B)

$\alpha\beta_{ij}$: Efecto de la interacción (AxB)

ϵ_{ijk} : Error Experimental

El esquema del experimento aplicado en el desarrollo de la presente investigación se describe en el (cuadro 2).

Cuadro 2. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

FACTOR A	FACTOR B	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE	TOTAL DÓISIS
Vitrificación	Andromed	VAM	10	3	30
	Triladyl	VTD	10	3	30
	OVIXcell	VOC	10	3	30
Congelamiento	Andromed	CLAM	10	3	30
Lento	Triladyl	CLTD	10	3	30
	OVIXcell	CLOC	10	3	30
TOTAL					180

T.U.E= Tamaño de la Unidad Experimental. (2 Dosis seminales de 0,5 ml).

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Las variables experimentales evaluadas durante el experimento fueron:

1. Evaluación de eyaculados

a. Características macroscópicas

- Volumen de fracción, ml.
- Color.
- Olor.
- pH.

b. Características microscópicas

- Motilidad masal, %
- Motilidad individual, ptos.
- Formas anormales, %
- Vitalidad espermática, %
- Concentración, Spz/ml

2. Evaluación de dosis seminales criopreservadas

- Motilidad masal, %
- Motilidad individual, ptos.
- Vitalidad espermática, %

3. Evaluación económica

- Determinación de ingresos y egresos, USD
- Relación beneficio/costo, USD

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados obtenidos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos, junto al esquema para el (ADEVA) (cuadro 3).

- Análisis de varianza (ADEVA).
- Pruebas de significación según Tukey, para separación de medias con el nivel $P < 0,05$ y $P < 0,01$.
- Estadística descriptiva (media y desviación estándar).

Cuadro 3. ESQUEMA DEL ADEVA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	59
Factor A	1
Factor B	2
Interacción A x B	2
Error	54

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. De campo

a. Selección de carneros

Para la selección de los carneros se consideró los siguientes aspectos:

- Animales de 2 años de edad.
- Buena simetría testicular.
- Exento de anormalidades físicas.
- Libre de lesiones en prepucio y pene.
- Buen estado de salud.

Se realizó una limpieza corporal de los animales, la misma que consistió en tuqueado y despálme.

Los carneros fueron sometidos a entrenamiento y habituados a la extracción mediante el uso de la vagina artificial, previo a la extracción final de semen, utilizando una hembra estrogenizada con la ayuda de una manga con cepo, la misma que fue tratada con 0,25 ml de benzoato de estradiol, el mismo que se llevó a cabo dos veces por semana.

b. Preparación de la vagina artificial

Colocamos en el interior de la vagina artificial una camisa de goma, los extremos de la manga fueron doblados hacia la parte externa de la vagina y fijados con ligas de presión, en uno de los extremos se colocó la copa recolectora de semen y un vial esterilizado; el espacio existente entre la camisa y el tubo se llenó con agua caliente hasta tres cuartos aproximadamente a 45°C de temperatura, enseguida se insufló aire por la válvula para generar la presión necesaria y extender la manga hacia el centro del tubo disminuyendo la luz de éste, simulando de esta manera la vagina de la hembra.

c. Extracción y manejo del semen

La recolección del semen se la realizó en un lugar limpio y libre de polvo, procediéndose a la limpieza del prepucio en donde se recortaron los pelos del mismo para evitar la contaminación del semen.

Después de asegurada la oveja en manga con cepo, el operador se ubicó al lado derecho del macho de modo que su mano diestra estaba sujetando la vagina con el extremo abierto frente al prepucio en un ángulo de 45 ° en relación al piso.

Una vez realizado el salto del macho el pene fue desviado lateralmente para ser enfrentado a la vagina artificial, la eyaculación se dio después de que el animal haya realizado movimientos de empuje curvando levemente el lomo lo que se denomina como golpe de riñón, este procedimiento no debe demorar más de 30 segundos.

Una vez obtenido el semen, fue trasladado rápidamente al laboratorio manteniéndolo protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa, e impurezas, razón por la cual se usó material seco y estéril, disminuyendo lentamente la temperatura del semen para continuar con la dilución.

2. De laboratorio

a. Exámenes macroscópicos y microscópicos

Primero se determinó el volumen de cada eyaculado mediante un vial colector graduado, evaluando las características macroscópicas del semen como color, olor y pH.

A continuación se evaluó las características microscópicas como motilidad masal e individual, formas anormales, vitalidad espermática y concentración colocando una pequeña gota de semen diluido sobre un portaobjetos previamente

temperado a 37°C mismo que fue observado al microscopio con aumentos de (100x y 400x totales).

b. Preparación de diluyentes

Los diluyentes fueron preparados de acuerdo a las recomendaciones técnicas de cada una de la casa comercial como se describe a continuación:

(1). Andromed

El diluyente AndroMed® debe diluirse en relación 1:4 con agua destilada estéril previamente temperada a +32°C, de acuerdo al volumen requerido es posible preparar Andromed, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado.

Para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30°C y +32°C.

Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado y entonces prediluido en relación 1:1. El eyaculado debe mantenerse en el baño-María entre +30°C y +32°C como máximo por 10 minutos. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). Una vez evaluado el eyaculado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20°C a +23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas de 0,5 ml y una concentración de 50×10^6 Spz. /dosis. Posteriormente, el semen diluido y envasado debe ser colocado en rejillas y equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C, antes de ser criopreservado.

(2). Triladyl

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres

partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, en relación 1:3:1, lo que significa que cada parte equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo una parte de concentrado de Triladyl® (20 %) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 60 % de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a +5°C por alrededor de una semana. Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 20 % de yema de huevo fresca, siempre y cuando se mantenga la proporción de Diluyente: Agua: Yema (1:3:1).

Se puede esterilizar la cáscara del huevo pasándolo por una llama. En seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, vertiendo la yema, sin romperla, de una a otra mitad de la cáscara. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se colocan una por una sobre papel de filtro, haciéndolas rodar sobre el papel, que retiene los restos. La yema de huevo se posiciona en el borde del papel filtro, se envuelve en el papel y se presiona para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel. Enseguida, se le agrega a la yema lentamente la solución madre, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl® (agregar la solución madre a la yema, no al revés). Para terminar, el diluyente preparado debe filtrarse a través de un filtro-embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su utilización.

Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado y entonces prediluido en relación 1:1. El eyaculado debe mantenerse en el baño-María entre +30°C y +32°C como máximo por 10 minutos. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). Una vez evaluado el eyaculado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20°C a +23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas de 0,5 ml y una concentración de 50×10^6 Spz. /dosis. Posteriormente, el semen diluido y envasado debe ser colocado en rejillas y equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C, antes de ser

criopreservado.

(3). OVIXcell

El diluyente OVIXcell debe diluirse en relación 1:4 con agua destilada estéril previamente temperada a +32°C, de acuerdo al volumen requerido es posible preparar OVIXcell, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado.

Para lograr las propiedades óptimas de conservación de OVIXcell, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado OVIXcell debe temperarse antes de su uso en un baño-María entre +30°C y +32°C.

Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado y entonces prediluido en relación 1:1. El eyaculado debe mantenerse en el baño-María entre +30°C y +32°C como máximo por 10 minutos. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). Una vez evaluado el eyaculado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20°C a +23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas de 0,5 ml y una concentración de 50×10^6 Spz. /dosis. Posteriormente, el semen diluido y envasado debe ser colocado en rejillas y equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C, antes de ser criopreservado.

c. Crioconservación

Los procesos de criopreservación y descongelación de dosis seminales se describen a continuación:

(1). Congelamiento lento

En relación a los protocolos empleados en cada uno de los diluyentes de acuerdo a la casa comercial, estrictamente el semen una vez que ha sido diluido y

envasado debe ser colocado en rampas de congelación y equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C, antes de ser criopreservado. La congelación de pajuelas se efectúa sobre estas rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, que se encontrará a una temperatura inicial de -120°C, por un lapso de 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml), seguidamente las pajuelas son inmediatamente sumergidas en N₂ líquido y posteriormente conservadas en un termo a -196 °C.

(2). Vitricación

La metodología de vitricación estuvo basada en la técnica utilizada por Dobrinsky, J. y col. (1991), exponiendo inicialmente el semen a la solución de equilibrio añadiendo el diluyente con 10 % de Glicerol por 10 minutos a +20 °C en relación 1:1, exponiéndolo posteriormente a la solución de vitricación con el diluyente restante al 25% de Glicerol, momento en el cual el semen diluido debe ser envasado en pajuelas de 0,5 ml y colocado en rampas y permanecer por 5 minutos a la misma temperatura hasta introducirlo en el N₂ líquido y posteriormente conservadas en un termo a -196 °C.

(3). Descongelación de pajuelas

Para la descongelación se realiza inmersión directa en agua a 38°C durante 10-30 segundos. De este modo la dosis llega a una temperatura intermedia (18-20°C) que favorece la manipulación a temperatura ambiente por corto tiempo.

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

1. Concentración

Para determinar la concentración espermática se utilizó la Cámara de Burker; en donde se realiza una dilución de semen puro 1:100 en una solución de Suero Fisiológico Formolado (9 gr de cloruro de sodio, 3 cc de formaldehído al 40 % y 1000 cc de agua destilada). Para lo cual utilizando un matraz tarado a 100 ml, se añade 1 ml de semen puro completando hasta 100 ml con la solución salina formolada homogeneizándose bien la solución. Posteriormente se toma una gota

con pipeta Pasteur, la cual se deposita en el retículo de la cámara. El conteo se realiza utilizando el microscopio a 400 aumentos y contando el número de espermatozoides que se encuentran dentro de 40 cuadrados pequeños del retículo de la cámara, los mismos que se multiplican por 1×10^7 para establecer el número de espermatozoides/ml.

2. Volumen

Para la determinación del volumen se utilizó el mismo vial con capacidad de 3 ml empleado en la recolección seminal el mismo que se hallaba graduado en fracciones decimales.

3. pH

Esta medición se la realizó a través de la utilización de papeles medidores de pH, al momento de la extracción del semen donde se colocó el papel directamente en la muestra, esperando unos segundos para observar la coloración del papel y luego se lo llevó a la tabla para comparar la coloración y estimar el pH de la muestra.

4. Motilidad masal

Con la ayuda de una pipeta, se aplicó una gota de semen en un portaobjetos seco y limpio en una platina térmica permitiendo que se caliente hasta 37°C. Se cubrió la gota con un cubreobjetos, con el fin de lograr una capa uniforme evitando que la muestra se seque. En el microscopio a un aumento de 100 X se examinó varios campos y se evaluó de una manera subjetiva el porcentaje de espermatozoides móviles en masa, como se muestra en el (cuadro 4).

Cuadro 4. CALIFICACIÓN DE MOVIMIENTO EN MASA.

Calificación	Movimiento en masa
Muy buena (75 - 100)	Remolinos rápidos
Buena (50 - 75)	Remolinos lentos
Regular (25 - 50)	Oscilante
Mala (0 - 25)	Vibración

Fuente: Camacho, D. (2000).

5. Motilidad individual

Para esta evaluación se colocó una gota de eyaculado fresco en la placa del porta objetos a temperatura de 37 °C y luego un cubre objetos, se observó al microscopio con el lente de mayor aumento (40X Objetivo), se evaluó la motilidad individual en una escala de 0 a 5 como se detalla en el, (cuadro 5).

Cuadro 5. CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD INDIVIDUAL.

Calificación	Motilidad individual
Muy buena (5)	Muy rápido
Buena (4)	Rápido
Regular (3)	Moderado
Mala (2)	Lento
Muy Mala (1)	Muy lento

Fuente: Camacho, D. (2000).

6. Vitalidad espermática

Sobre un portaobjetos previamente calentado a 37 °C en una platina térmica, se colocó una gota de semen y una gota de solución de eosina-nigrosina previamente calentada a 37°C para evitar el shock térmico. Luego de 1 minuto se realizó un frotis, observándolo al cabo de 2 min, sin cubreobjetos con aumento 100X. Los espermatozoides muertos se tiñen de rojo ya que la membrana deteriorada en los muertos se hace permeable, determinando de manera subjetiva el % de vitalidad espermática.

7. Formas anormales

Al mismo tiempo de realizar la evaluación de vitalidad espermática se puede determinar el % de formas anormales en forma subjetiva, determinando anomalías como gotas citoplasmáticas, cola en látigo, cola en ovillo, cabeza pequeña, aglutinaciones, etc.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL EYACULADO DE CARNERO, PARA LA POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN.

A continuación describimos las características macroscópicas y microscópicas determinadas en 12 extracciones de semen proveniente de 2 carneros de raza Corriedale de 2 años de edad, los mismos que posteriormente fueron procesados y crioconservados.

1. Color y olor

La coloración que presentaron los eyaculados de carnero, en las diferentes extracciones fue blanco cremoso, lo que se debe a la concentración espermática sin ningún tipo de contaminante y el olor fue proteico neutro característico en el semen de esta especie, libre de olores desagradables que podrían ser provocados por contaminación bacteriana, como se reporta en el (cuadro 6).

Con respecto a estos resultados Rodríguez, F. et al. (2007), manifiestan que el color en el semen de carnero es un parámetro que se toma en cuenta bajo condiciones de campo y se realiza observando la opacidad de la muestra dentro del tubo de recolección; una muestra se clasifica como: buena, cuando la muestra es de color crema y de consistencia espesa; regular, cuando tienen una tonalidad grisácea; y mala cuando la coloración es blanco diluido. Además (Hafez, E. et. al., 2004; Evans, G. et. al., 1990), aducen que el semen del carnero es de color crema pálido o lechoso, la coloración rosácea indica presencia de sangre, el semen gris indica o sugiere contaminación del tracto reproductivo, mientras que el semen amarillento y diluido es indicativo de contaminación con orina.

2. Volumen del eyaculado

El volumen del eyaculado de la fracción rica, obtenida en las diferentes recolecciones de semen, presentó un promedio de $0,96 \pm 0,04$ ml, lo cual está

dentro de los rangos normales de un reproductor de dos años de edad.

Al respecto Vera, N. (2009), en una investigación realizada empleando diferentes métodos de recolección de semen, determinó que la vagina artificial es el mejor método para la obtención de semen en el ganado ovino. El volumen normal de eyaculado por carnero adulto es de 0,5 a 2 ml y en carneros jóvenes de 0,5 a 0,7ml, por otro lado Hafez, E. et. al., (2004); Evans, G. et. al., (1990), manifiestan que el volumen del semen depende del método de recolección, la edad y estado del carnero, la habilidad del recolector y la frecuencia de obtención de muestras, por lo que el volumen obtenido en la presente investigación se encuentra dentro de los rangos normales.

3. Potencial hidrógeno

El pH del eyaculado de la fracción rica obtenida en las diferentes recolecciones realizadas a los carneros de la raza Corriedale, presentó un promedio de $6,70 \pm 0,16$, lo cual está dentro de los rangos normales, cuadro 6.

A lo anterior descrito Hintz, H. et. al., (1987), citan que el pH del eyaculado del carnero se ubica en un rango de 5,9 a 7,3; además Illera, M. (1994) manifiesta que el aumento de pH es indicador de contaminación con orina, sin embargo el semen recolectado se halla dentro de los rangos normales.

4. Concentración espermática

La concentración espermática es una de las características microscópicas más importantes del semen ya que de ello depende la cantidad de dosis seminales que se puedan obtener de cada eyaculado, es así que el número de espermatozoides por ml de eyaculado, presentó un promedio de $3281,67 \pm 39,04 \times 10^6$ espermatozoides/ml, con lo que se puede elaborar $58,50 \pm 8,96$ dosis seminales con una concentración de 50×10^6 espermatozoides en/0,5 ml.

A lo relacionado Hafez, E. et. al., (2004); Evans, G. et. al., (1990), indican que la

concentración normal en carneros se ubica de $3,5 \times 10^9$ a $6,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml. La concentración se mide en forma directa usando hemocitometría (cámara de Burker), densimetría (método de Karras) o espectrofotometría (Spermacue).

5. Motilidad masal e individual

La motilidad masal observada microscópicamente, en las diferentes recolecciones realizadas, presentó un promedio de $99,00 \pm 1,04$ %, lo cual está dentro de los rangos normales, de un semen de calidad, aunque para la evaluación de este parámetro se necesita mucha experiencia ya que la apreciación de esta variable es subjetiva. La motilidad individual observada microscópicamente, en las diferentes recolecciones de eyaculados de carnero de la raza Corriedale, presentó un promedio de $4,97 \pm 0,05$ puntos, lo cual indica que los espermatozoides en general presentaron movimientos progresivos y muy rápidos, cuadro 6.

Padrón, R. et al., (1998), manifiesta que cuanto más grande es la intensidad de la formación de los remolinos, mayor es la motilidad y el número de espermatozoides móviles. Esta apreciación consiste en estimar el porcentaje (0-100%) de espermatozoides con movimiento en una muestra de semen (Evans y Maxwell, 1989; Fiser y Fairfull, 1989). Al mismo tiempo puede valorarse la calidad de ese movimiento en una escala de 0-4 (Robertson y Watson, 1986; Suttíyotin y Thawaiter, 1991) o de 0-5 en orden a la progresión de ese movimiento (Fiser y Fairfull, 1989; Pontbriand et al., 1989). Sin embargo, en términos generales un semen a ser procesado debe tener el 80% de motilidad masal con un rango del 70-90% (Mobini, S. 2002).

6. Formas anormales

Las formas anormales observadas microscópicamente en los eyaculados de la Raza Corriedale, analizado en las diferentes recolecciones, presentó un promedio de $1,83 \pm 0,72$ %, lo que señala que los espermatozoides en general son de estructura normal, sin embargo se determinaron espermatozoides con gota citoplasmática, cola en látigo y cola en ovillo en el porcentaje anteriormente

Cuadro 6. EVALUACIÓN SEMINAL DE LOS EYACULADOS DE CARNEROS CORRIEDALE, ANTES DE SER SOMETIDOS A DILUCIÓN PARA SU POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN.

CARACTERÍSTICA	Promedio	DS
Número de extracciones (n)	12	-
Color	Blanco cremoso	-
Olor	Proteico neutro	-
Volumen de eyaculado (ml)	0,96	0,04
pH	6,70	0,16
Concentración (1×10^6 Spz./ml)	3281,67	39,04
Motilidad masal (%)	99,00	1,04
Motilidad individual (pts.)	4,97	0,05
Formas anormales (%)	1,83	0,72
Vitalidad (%)	99,58	0,51
Número de dosis seminales (Unidad con 50×10^6 Spz./0,5 ml)	58,50	8,96

Referencia: Análisis de Laboratorio Reprogenes. (2015).

indicado que es bajo.

Según Hafez, E. et. al., (2004), manifiestan que las anomalías morfológicas espermáticas están relacionadas con la fertilidad o infertilidad del macho y se asocian con las condiciones medioambientales que ocasionan estados de estrés (especialmente calor y humedad).

Por su parte López, A. et. al., (2011), indican que las formas anormales se clasifican como anomalías de cabeza (defectos de acrosoma, cabezas sueltas anormales, piriformes, estrechos en la base, contorno anormal, tamaño diferente); de pieza media (anormal o abaxial); de cola (doblada simple, doblada terminal); gotas citoplasmáticas proximales o distales y cabezas sueltas normales, muchas de las cuales no fueron identificadas en el semen de carnero.

7. Vitalidad

La Vitalidad espermática evaluada por la integridad y calidad de la membrana del espermatozoide, mediante la técnica de tinción con Eosina-Nigrosina, presentó un promedio de $99,58 \pm 0,51$ %, lo que indica que el semen es clasificado de excelente calidad, ya que el mayor porcentaje de vitalidad indica óptima integridad de la membrana citoplasmática. Al respecto Rodríguez, F. (2007), al congelar el semen debe existir un buen porcentaje de vitalidad ya que solo alrededor del 50% de los espermatozoides mantienen su viabilidad luego de la descongelación, (cuadro 7).

B. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN EL SEMEN CRIOPRESERVADO, FRENTE A LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CONGELACIÓN Y DILUYENTES COMERCIALES.

1. Motilidad masal pre criopreservación

La motilidad masal determinada en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se identificó la mejor motilidad masal en el semen, al emplear el sistema de congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 98,60 %,

Cuadro 7. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE SEMEN HETEROSPÉRMICO DE CARNERO, SOMETIDO A CRIOPRESERVACIÓN MEDIANTE VITRIFICACIÓN Y CONGELAMIENTO LENTO, UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES.

VARIABLES	CONGELAMIENTO LENTO			VITRIFICACIÓN			EE	Prob.
	TRILADYL	ANDROMED	OVIXCELL	TRILADYL	ANDROMED	OVIXCELL		
Pre criopreservación seminal								
Motilidad masal, (%)	98,60 a	85,30 b	75,60 c	60,50 d	45,60 e	40,50 f	0,17	0,0001 **
Motilidad individual, (Ptos.)	4,95 a	4,25 b	4,15 b	3,30 c	2,70 d	1,70 e	0,12	0,0006 **
Vitalidad espermática, (%)	97,60 a	84,30 b	74,60 c	59,50 d	44,60 e	39,50 f	0,17	0,0001 **
Criopreservación a los 45 días								
Motilidad masal, (%)	60,50 a	25,40 b	8,50 c	4,50 d	2,50 e	0,30 f	0,16	0,0001 **
Motilidad individual, (Ptos.)	4,80 a	4,15 b	4,00 b	2,30 c	1,70 d	0,70 e	0,12	0,0007 **
Vitalidad espermática, (%)	59,50 a	24,40 b	7,50 c	3,50 d	1,50 e	0,20 f	0,16	0,0001 **
Criopreservación a los 90 días								
Motilidad masal, (%)	60,30 a	25,20 b	8,50 c	4,40 d	2,40 e	0,30 f	0,16	0,0001 **
Motilidad individual, (Ptos.)	4,80 a	4,10 b	4,00 b	2,20 c	1,60 d	0,20 e	0,11	0,0001 **
Vitalidad espermática, (%)	59,30 a	24,30 b	7,30 c	3,30 d	1,40 e	0,10 f	0,15	0,0001 **

Letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($P < 0,05$ y $P < 0,01$).

Prob: Probabilidad de la H_0 .

Andromed con 85,30 % de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio alcanzado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 75,60 %, encontrándose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear el sistema de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 60,50; 45,60 y 40,50 % de motilidad masal respectivamente. De acuerdo al gráfico 1.

Los resultados determinados al utilizar Triladyl son superiores a los registrados por Sandoval, M. (2007), quien en su estudio sobre criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores a base de tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo, agua bidestilada, glicerol, trehalosa y EDTA determinó una motilidad del 89,05 % en semen fresco luego del periodo de estabilización, lo cual estaría relacionado con los componentes de cada diluyente empleado, como medio para la conservación espermática.

2. Motilidad individual pre criopreservación

La motilidad individual registrada en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se identificó la mejor motilidad individual en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 4,95 pto, seguido por el valor alcanzado en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 4,25 pto de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio establecido en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 4,15 pto, alcanzándose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 3,30; 2,70 y 1,70 de motilidad individual respectivamente. Como se aprecia en el gráfico 2.

3. Vitalidad espermática pre congelación

La vitalidad espermática establecida en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se identificó la mejor vitalidad espermática en el semen, al emplear así

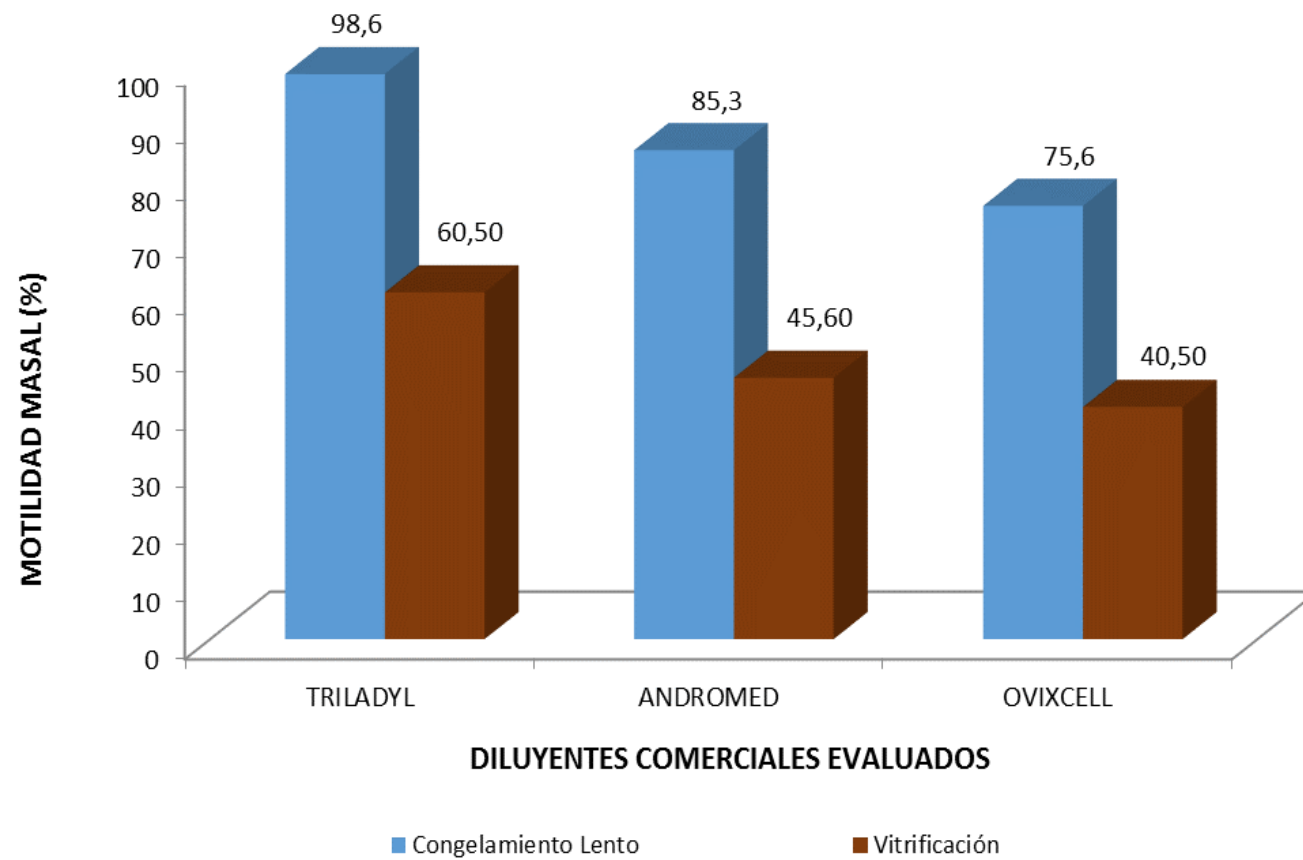


Gráfico 1. Motilidad masal del semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

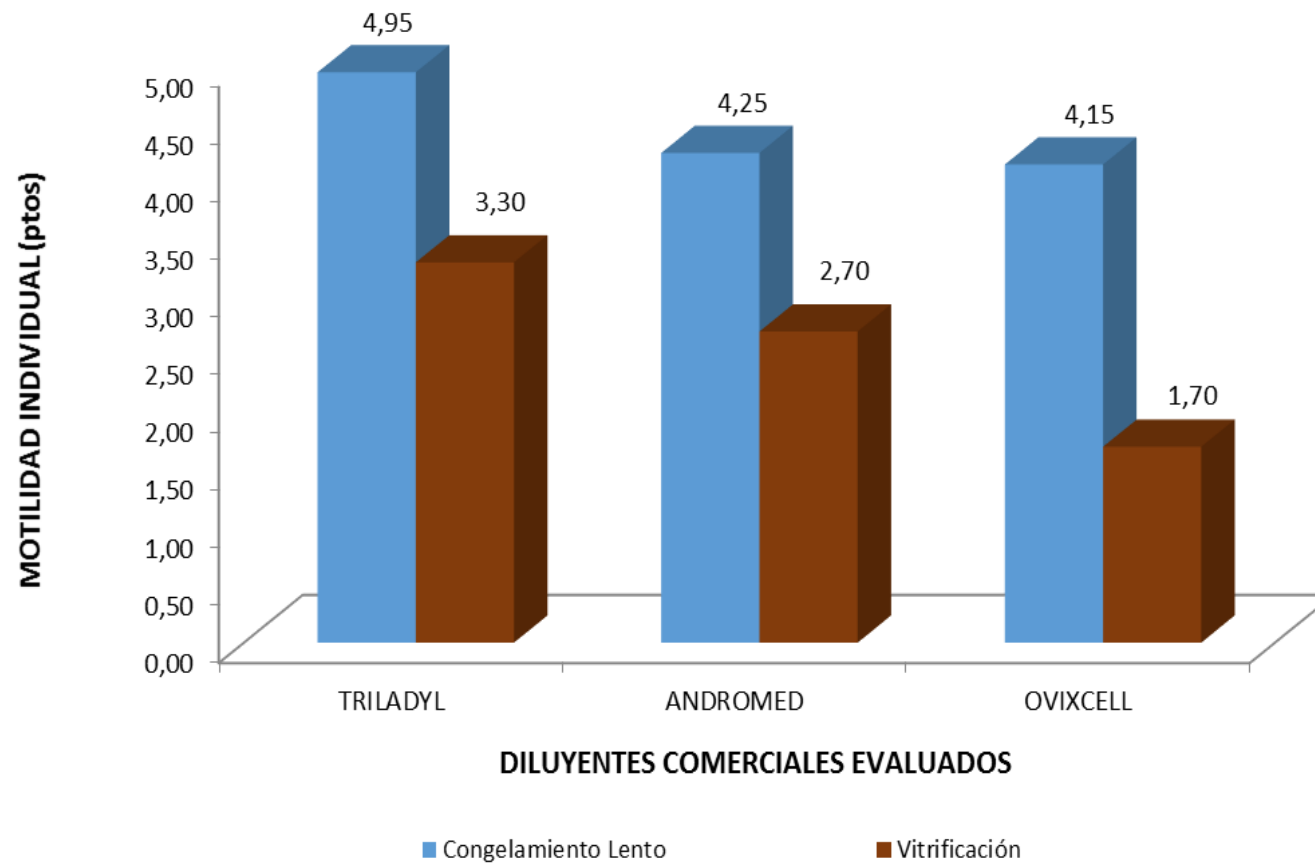


Gráfico 2. Motilidad individual del semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

que se identificó la mejor vitalidad espermática en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 97,60 %, seguido por el valor reportado en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 84,30 % de vitalidad, posteriormente fue registrado el promedio determinado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 74,60 %, hallándose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitrificación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 59,50; 44,60 y 39,50 % de vitalidad espermática respectivamente. De acuerdo al gráfico 3.

El valor determinado al utilizar Triladyl en la presente investigación es superior al registrado por Sandoval, M. (2007), quien en su estudio sobre criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores a base de tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo, agua bidestilada, glicerol, trehalosa y EDTA determinó una vitalidad del 86,58 % en semen fresco luego del periodo de estabilización, lo que se halla relacionado con la eficiencia del diluyente, por brindar mejores condiciones de estabilización para los espermatozoides.

4. Motilidad masal a los 45 días de criopreservación

La motilidad masal reportada en el semen de carnero luego de los 45 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se determinó la mejor motilidad masal a los 45 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 60,50 %, seguido por el valor obtenido en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 25,40 % de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio calculado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 8,50 %, estableciéndose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitrificación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 4,50; 2,50 y 0,30 % de motilidad masal a los 45 días respectivamente. Se puede apreciar en el gráfico 4.

Al emplear el diluyente Triladyl, se obtuvieron resultados similares a los reportados por Ruiz, G. et al. (2007), quien en su investigación sobre el efecto de

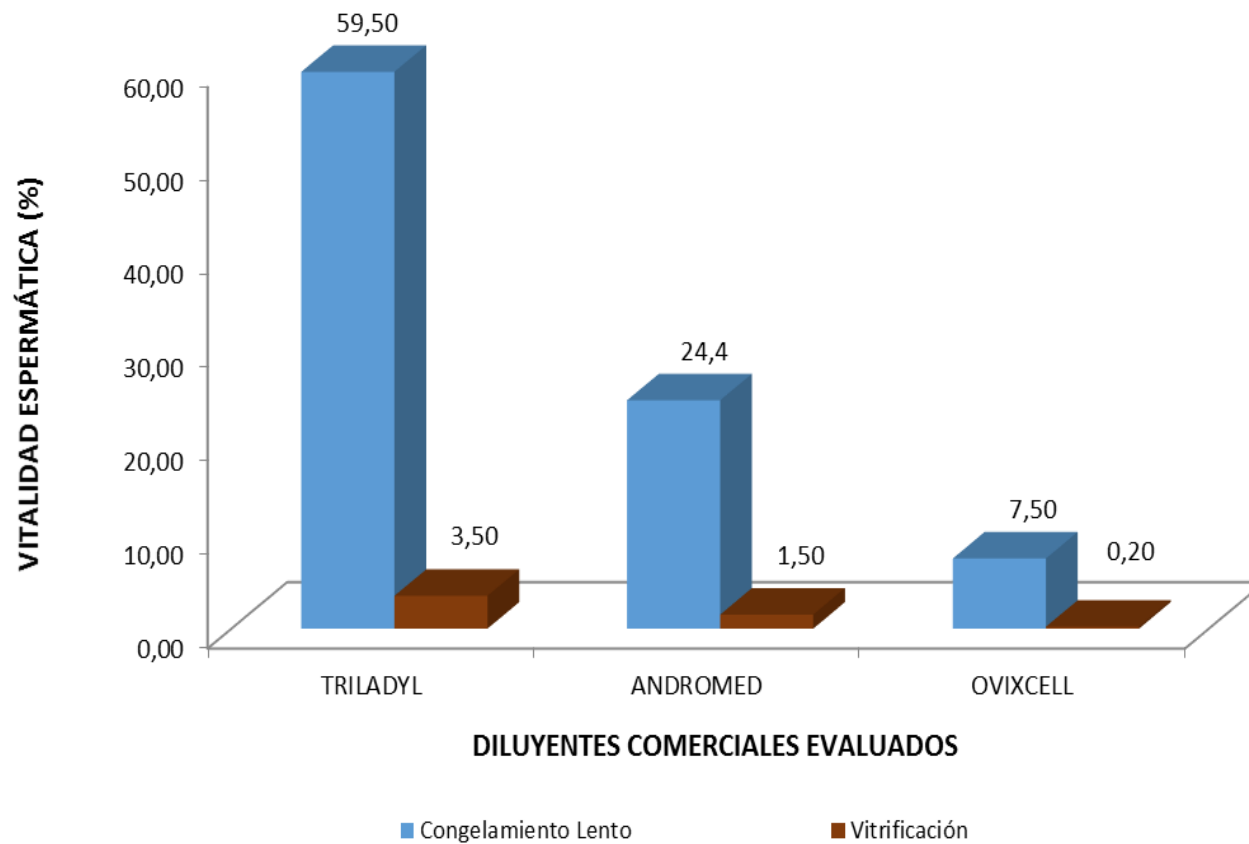


Gráfico 3. Vitalidad espermática en el semen ovino antes de la criopreservación por congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

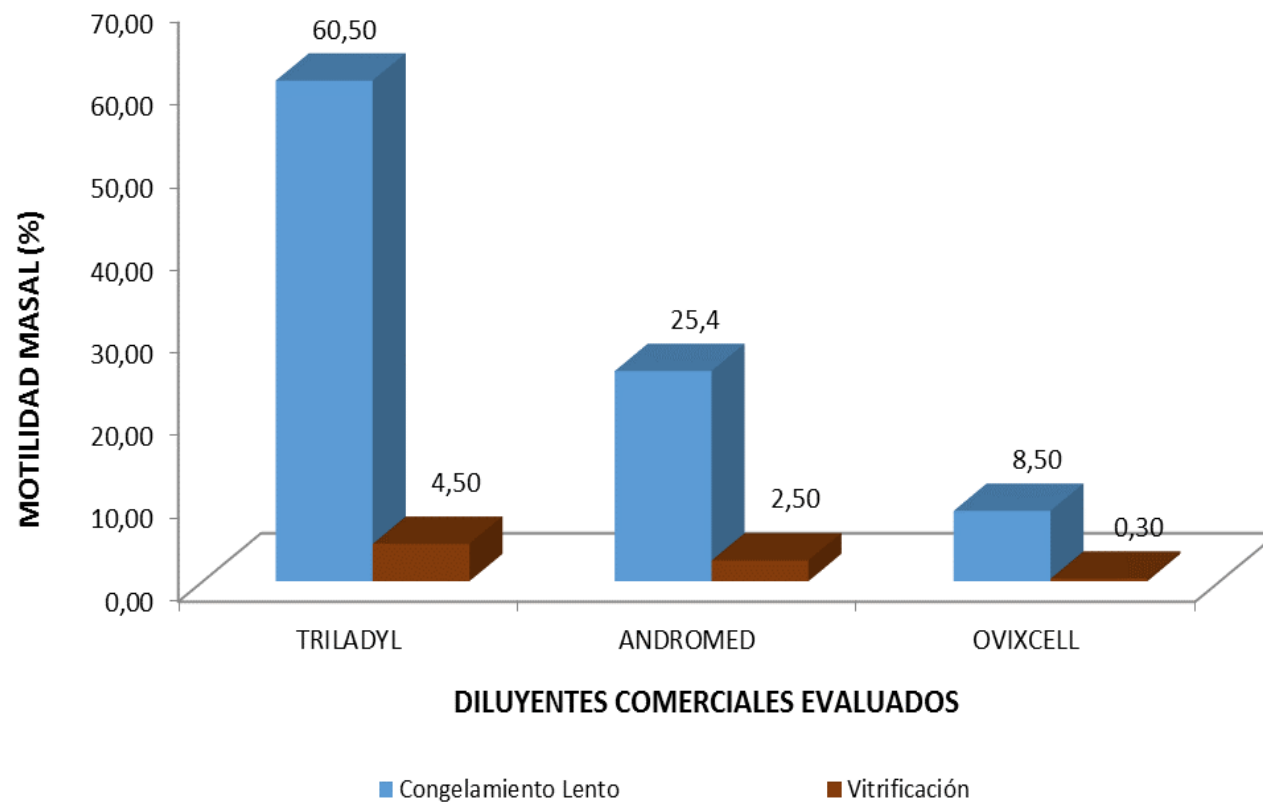


Gráfico 4. Motilidad masal del semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

empleando un dilutor en base a tris, obtuvo una motilidad de 66,9 %, lo que se encontraría relacionado con la composición de los diluyentes.

5. Motilidad individual a los 45 días de criopreservación

La motilidad individual obtenida en el semen de carnero luego de los 45 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se determinó la mejor motilidad individual a los 45 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 4,80 ptos, seguido por el valor determinado en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 4,15 ptos de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio alcanzado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y OviXcell con una media de 4,00 ptos, estableciéndose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y OviXcell donde se registraron promedios de 2,30; 1,70 y 0,70 ptos de motilidad individual a los 45 días respectivamente. Lo cual se puede estimar en el gráfico 5.

6. Vitalidad espermática a los 45 días de criopreservación

La vitalidad espermática cuantificada en el semen de carnero luego de los 45 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se identificó la mejor vitalidad espermática a los 45 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 59,50 %, seguido por el valor establecido en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 24,40 % de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio alcanzado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y OviXcell con una media de 7,50 %, obteniéndose menores vitalidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y OviXcell donde se registraron promedios de 3,50; 1,50 y 0,20 % de vitalidad espermática a los 45 días respectivamente. Se puede observar en el gráfico 6.

Los resultados obtenidos al emplear Triladyl, son similares a los reportados por Ruiz, G. et al. (2007), quien en su investigación sobre el efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando

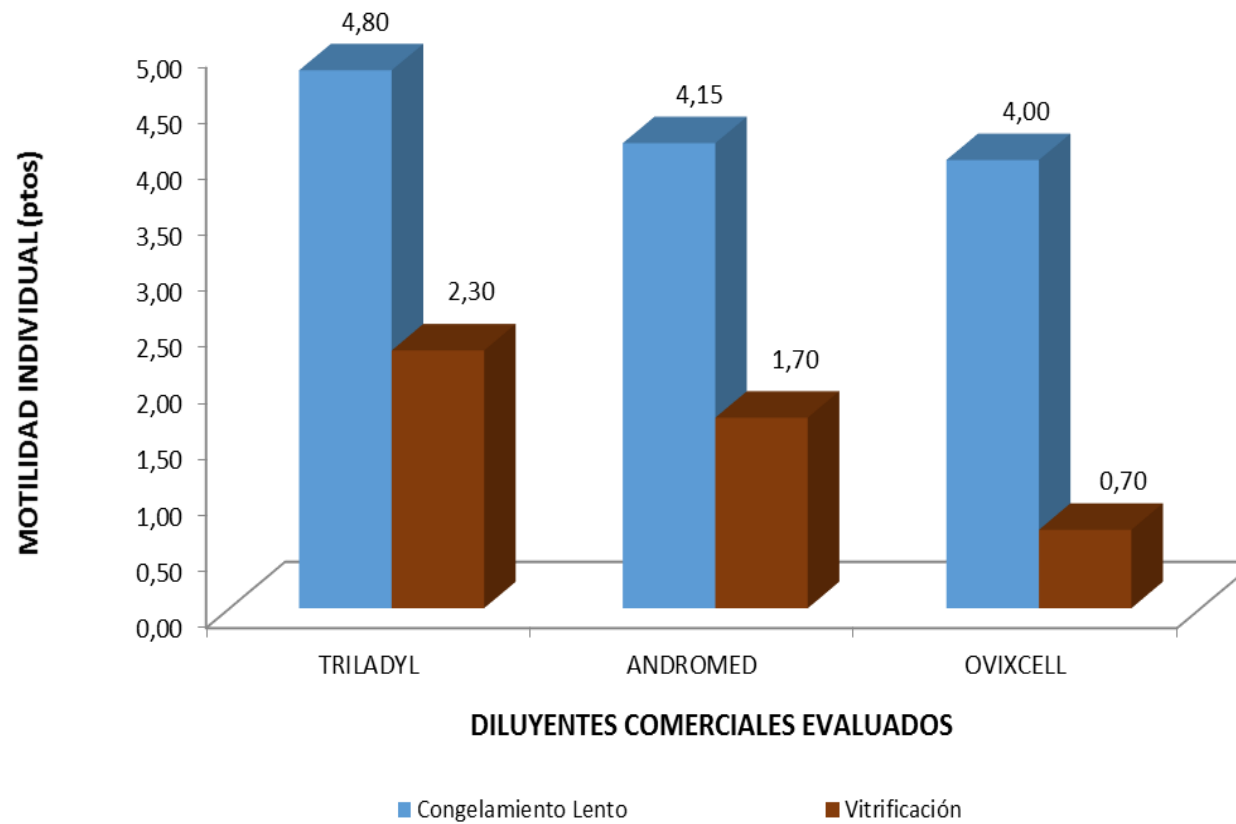


Gráfico 5. Motilidad individual del semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

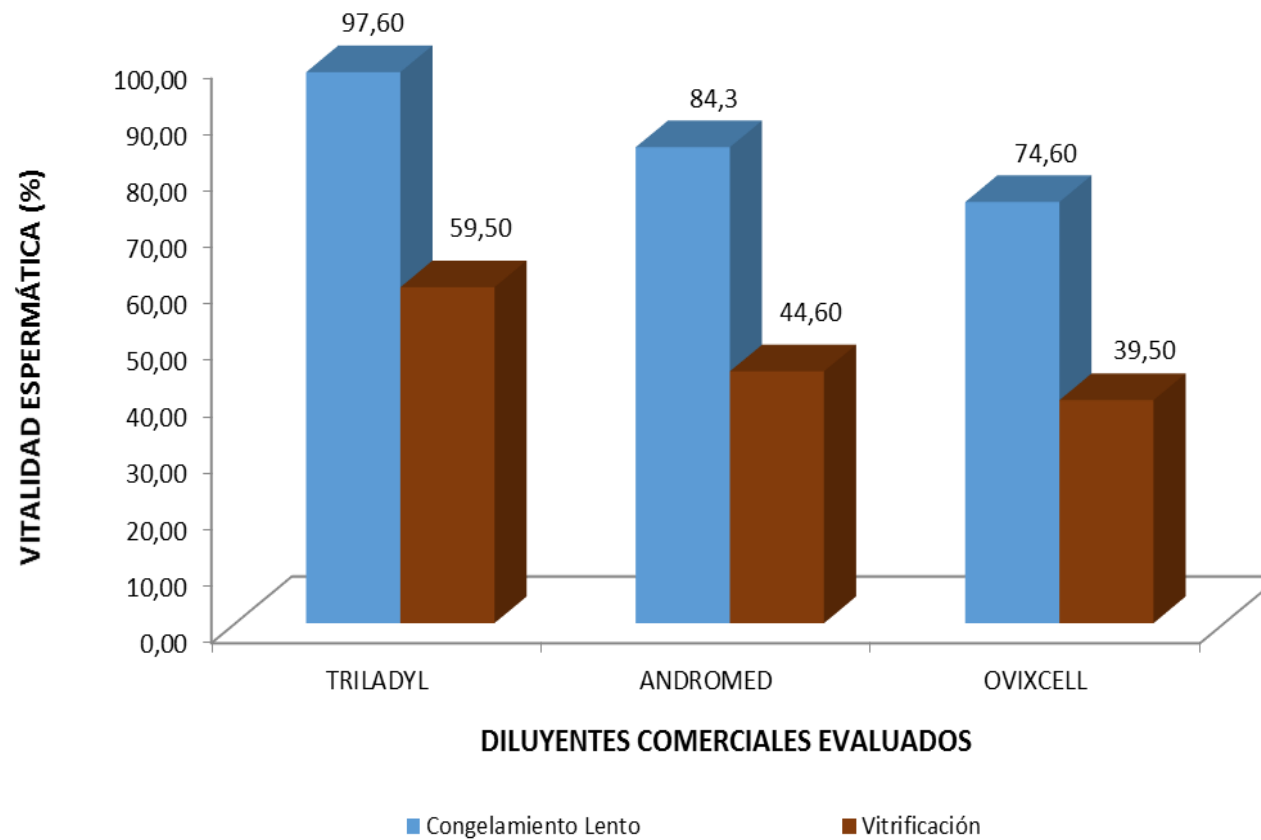


Gráfico 6. Vitalidad espermática en el semen ovino a los 45 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

un dilutor en base a tris, alcanzó una vitalidad de 58,4 % lo que corresponde a una mejor adaptación de los espermatozoides de acuerdo a la composición de los diluyentes evaluados.

7. Motilidad masal a los 90 días de criopreservación

La motilidad masal determinada en el semen de carnero luego de los 90 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se estableció la mejor motilidad individual a los 90 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 60,30 %, seguido por el valor identificado en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 25,40 % de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio calculado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 8,50 %, alcanzándose menores motilidades espermáticas a los 90 días en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 4,40; 2,40 y 0,30 % de motilidad masal a los 90 días respectivamente. Como se aprecia en el gráfico 7.

Respecto a estos resultados Sandoval, M. (2007), en su estudio sobre criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes, alcanzó una media de 69,29 % en el mejor diluyente, resultando levemente superior al valor de motilidad determinado al emplear Triladyl en la presente investigación, lo que se encontraría relacionado con la constitución química del diluyente.

8. Motilidad individual a los 90 días de criopreservación

La motilidad individual reportada en el semen de carnero luego de los 90 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), es así que se alcanzó la mejor motilidad individual a los 90 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 4,80 pts, seguido por el valor establecido en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 4,10 pts de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio determinado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell

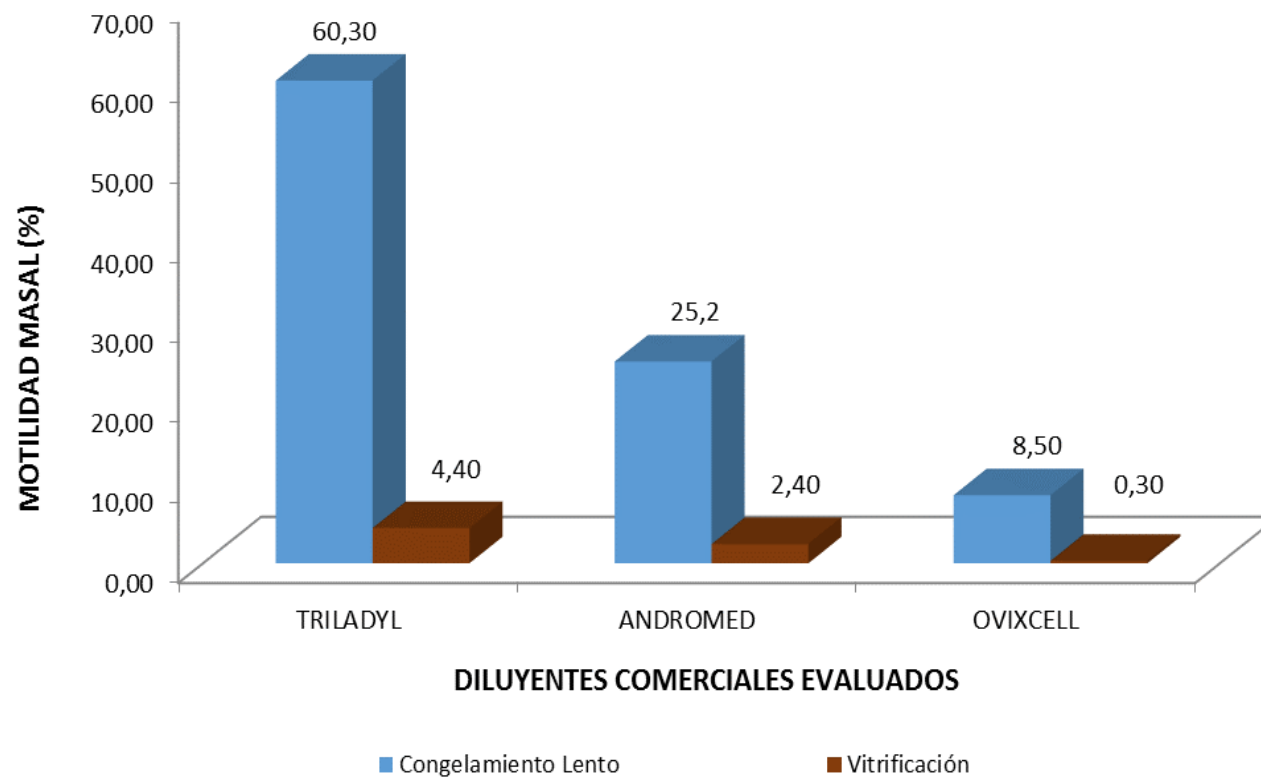


Gráfico 7. Motilidad masal del semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

con una media de 4,00 pts, registrándose menores motilidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 2,20; 1,60 y 0,20 pts de motilidad individual a los 90 días respectivamente. Según el gráfico 8.

9. Vitalidad espermática a los 90 días de criopreservación

La vitalidad espermática establecida en el semen de carnero luego de los 90 días en criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P<0,01$), es así que se obtuvo la mejor motilidad individual a los 90 días en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 59,30 %, seguido por el valor establecido en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 24,30 % de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio registrado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 7,30 %, reportándose menores vitalidades espermáticas en el semen, al emplear la técnica de Vitricación y los diluyentes Triladyl, Andromed y Ovixcell donde se registraron promedios de 3,30; 1,40 y 0,10 % de vitalidad espermática a los 90 días respectivamente. Como se muestra en el gráfico 9.

Los promedios obtenidos al emplear Triladyl son comparables a los resultados determinados por Sandoval, M. (2007), en su estudio sobre criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes, donde alcanzó una media de 63,12 % de vitalidad espermática, posiblemente relacionado con la composición química de los diluyentes, lo que permite una mejor conservación de la membrana citoplasmática.

C. EVALUACIÓN ECONÓMICA EN LA PRODUCCIÓN DE SEMEN DE CARNERO PROCESADO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CRIOPRESERVACIÓN Y USO DE DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES.

Para el análisis económico se consideraron, los egresos alcanzados por los costos en los diferentes grupos experimentales y los ingresos obtenidos mediante la cotización de las dosis seminales criopreservadas de acuerdo a su calidad,

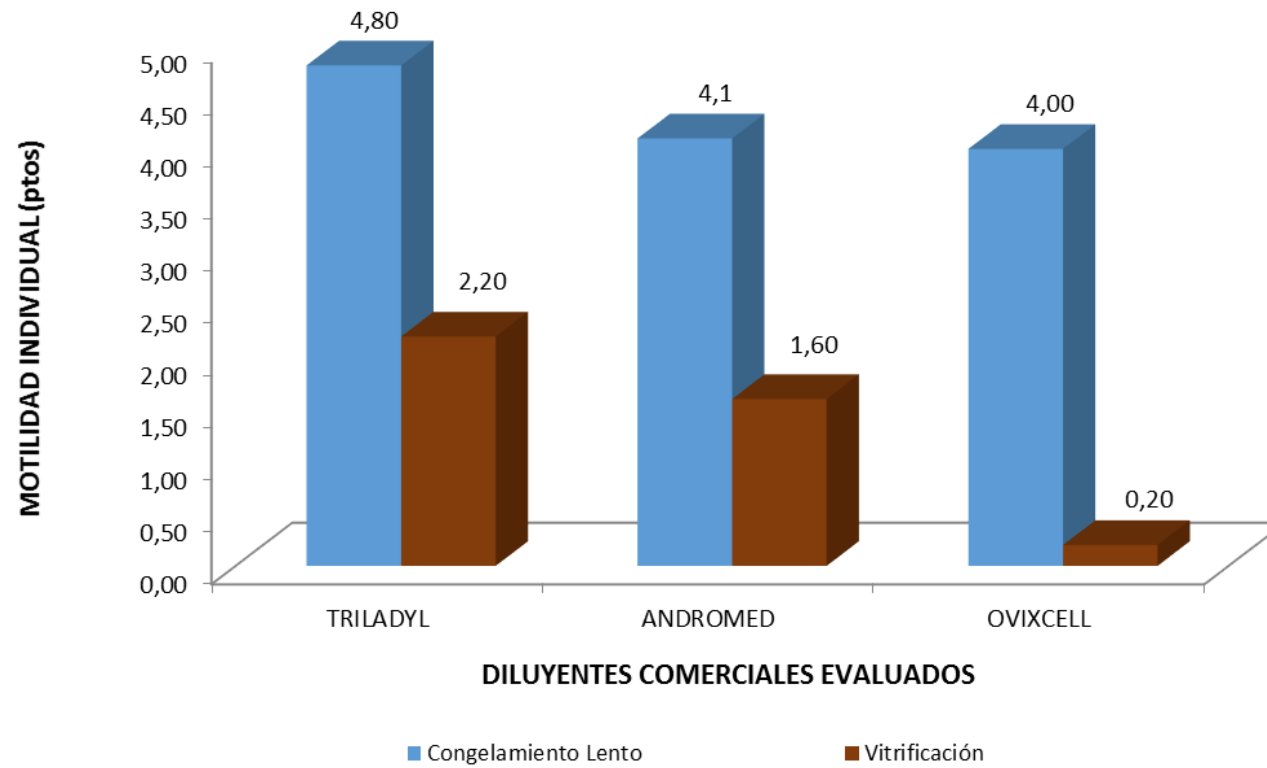


Gráfico 8. Motilidad individual del semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

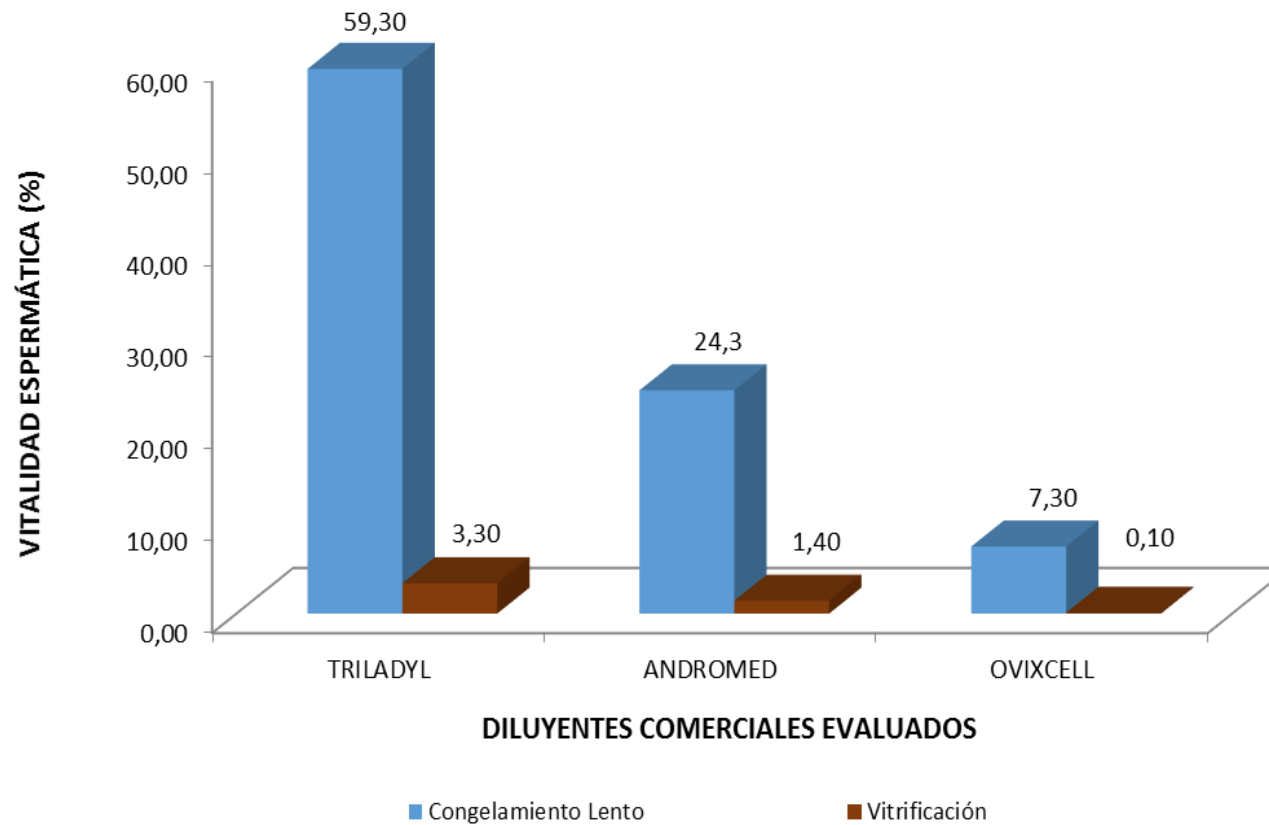


Gráfico 9. Vitalidad espermática en el semen ovino a los 90 días de criopreservación luego de someterse a congelamiento lento y vitrificación, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

obteniéndose el mejor Beneficio - Costo al emplear Congelamiento Lento y diluyente Triladyl con 2,017 USD, lo que quiere decir que por cada dólar invertido en este procedimiento se obtiene un beneficio neto de 1,017 USD, posteriormente con resultados que impiden la utilización de las dosis seminales de ubicaron los demás tratamientos evaluados, (cuadro 8).

Estos resultados nos permiten exponer con seguridad que la utilización de un sistema de criopreservación y diluyente adecuado para el semen de carnero cuando es procesado y posteriormente utilizado en inseminación artificial, repercute sobre el valor y la garantía de la dosis seminal.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha determinado características macroscópicas adecuadas dentro de los rangos permisibles sobresaliendo el volumen que presentó un promedio de $0,96 \pm 0,04$ ml y parámetros microscópicos óptimos, donde se resalta la motilidad masal (99,0 %) y concentración que alcanzó una media de $3281,67 \pm 39,04 \times 10^6$ Spz/ml, lo que permitió obtener hasta un promedio de 58 dosis seminales por eyaculado.
2. Al final del periodo de estabilización del semen de carnero en dilución, se ha determinado diferencia notables en cuanto a la motilidad masal (98,60 %), motilidad individual (4,95 ptos) y vitalidad espermática (97,60 %) al utilizar Triladyl en relación a los demás diluyentes de criopreservación empleados.
3. Luego de la descongelación del semen a los 90 días de criopreservación, únicamente el semen que fue sometido a Congelamiento lento y diluyente Triladyl mantuvo las características idóneas para ser utilizado en programas de inseminación artificial de ovejas, con 60,30 %, 4,80 ptos. y 59,30 % de motilidad masal, motilidad individual y vitalidad espermática respectivamente.
4. El mejor Beneficio - Costo se estableció en las dosis seminales obtenidas al emplear Congelamiento Lento y diluyente Triladyl con 2,017 USD, lo que quiere decir que por cada dólar invertido en este procedimiento se obtiene un beneficio neto de 1,017 USD.

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar el sistema de criopreservación mediante congelamiento lento y diluyente Triladyl para el semen de carnero, ya que presentó resultados satisfactorios en calidad lo que permitirá cotizar la producción de dosis seminales en forma rentable.
2. Emplear un solo termo para la utilización de pajuelas, ya que si se utiliza el mismo termo para la congelación de semen de varias especies, puede ocasionar daños a las características espermáticas y el semen criopreservado no estaría apto para la inseminación artificial.
3. Realizar empadres con lotes de 25 a 30 hembras; para obtener partos intensivos, además preparar a los animales en cuanto a condición corporal (no gordos no flacos), también mineralizar y vitaminizar.
4. Socializar la información obtenida en la presente investigación a nivel de Centros de procesamiento de semen y Granjas semi-intensivas e intensivas de ovinos recomendando la utilización del sistema de criopreservación de congelamiento lento con el diluyente adecuado.

VIII. LITERATURA CITADA

2. AGUILAR, E. 2005. Variaciones estacionales de características seminales, circunferencia escrotal y comportamiento sexual de carneros de las razas Hampshire, Corriedale y Suffolk. Tesis de Maestría. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires - Argentina. p.78.
3. AISEN, E. y VENTURINO, A., 2004. Reproducción ovina y caprina. Primera ed. Buenos Aires: Inter-Médica S.A.I.C.I.
4. ARAV, A., y ZERON, A. OCHERENTY. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 247. Abst.
5. BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. pp. 68: 181-90.42
6. BEDFORD, S.; JASKO, D.; GRAHAM, J.; AMANN, R.; SQUIRES, E.; PICKETT, B. 1995. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. pp.43: 955-67.
7. BERLINGUER, F.; LEONI, G.; SUCCU, S.; MOSSA, F.; GALIOTO, M.; MADEDDU, M.; NAITANA, S. 2007. Cryopreservation of european mouflon (*ovis gmelini musimon*) semen during the non breeding season is enhanced by the use of trehalose. *Reproduction in Domestic Animals*. pp. 42: 202-07.
8. BRASS, K.; PALMA, G. 2008. Inseminación artificial en la especie equina. En: Palma, G. *Biología de la Reproducción*. Mar del Plata, ReproBiotec, 2ª edición, pp. 547- 87.
9. BRINSKO, S.; VARNER, D. 1992. Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 8: 205-18.

10. BLANCHARD, T. (2000). Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 53:pp. 1641-55.
11. CELESTINOS M Y GATICA, R. 2002. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch Med Vet* 34, pp. 157 – 165.
12. CUETO, M.; GIBBONS, A. 2004. Eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en ovinos. *IDIA XXI, INTA Buenos Aires*. A.4:pp. 73-8.
13. CUETO, M.; GIBBONS, A. 2005. Evaluación de la inseminación artificial en ovinos. *Memorias del VII Curso de Actualización en Producción Ovina*. Ediciones INTA. Argentina. p. 244.
14. DOBRINSKY, J. R., F.F. HESS, R. T. DUBY, J. M. ROBL. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. *Theriogenology*. 37:20. Abst.
15. EVANS, G. y MAXWELL, W. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: ACRIBIA, 1990. ISBN: 84-200-0675-0.
16. FIERRO FERNÁNDEZ, S. 2005. Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo y glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado (5° C): ensayos in vitro e in vivo en majadas merino fino. (Tesis de Grado). Universidad de la República.
17. FERNÁNDEZ ABELLA, D.; BONILLA RIERA, C.; BONILLA RIERA, R.; VILLEGAS, N.; IBÁÑEZ, W. 2001. Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5° C sobre el transporte espermático. *SUL Producción Ovina*. 14: pp. 55-63.
18. GILLAN, L.; MAXWELL, W.; EVANS, G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and*

Development. 16:pp. 447-54

19. GÓMEZ, M. 2010. Fisiología de la reproducción. Talleres de inseminación y viabilidad del semen. México.
20. HAFEZ, E. 1990. Blackwell Scientific Publications. Reproduction in farm animals. 4th edition. Philadelphia, U S A: Lea & Febiger. 22, p. 512.
21. HAFEZ, E.; HAFEZ, B. 2002 Reproducción e inseminación artificial. Carolina del Sur, Interamericana, 7ª edición, p.519.
22. HAFEZ, E. y HAFEZ, B. 2004. Reproducción e inseminación artificial en animales. Edit. McGraw-Hill Inteamericana. ISBN: 0-683-30577-8.
23. HEROLD, F.C., GERBER, D., AURICH, J.E. 2002: Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl® or AndroMed®. Wiener Tierärztliche Monatsschrift, pp. 90, 61.
24. HINTZ, H; LEGATES, J; LOOSLI, J; MAYNARD, L; SORENSES, A; WARNER, R; WARWICK, E. 1987. Guía para la reproducción, nutrición, cría y mejora del ganado. 1ra. ed. Edit. McGraw-Hill. Vol. I. ISBN: 968-422-268-8. p. 286.
25. ILERA, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Madrid: AEDOS, 1994. ISBN: 84-7003-339-5.p. 32.
26. ILLERA, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Madrid: AEDOS, 1994. ISBN: 84-7003-339-5.
27. JANETT, F., FUSCHINI, E., KEO, S., THUN, R. 2005: Comparison of AndroMed® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen. ESDAR Conference, Murcia.
28. LAING, J., BRINLEY, W. y WAGNER, W. 1990. Fertilidad e Infertilidad en la práctica veterinaria. México DF. Limusa, S. A., ISBN: 968-18- 0319-1.
29. LÓPEZ, A; REGUEIRO, M; CASTRILLEJOS, A; PÉREZ, R. 2011. Morfología

espermática en carneros: efectos del plano nutricional y de la época del año. http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/171-espermatoca_15.pdf

30. MEJÍA A. 2003. Memorias del curso teorico – práctico “inseminación artificial en ovinos”. Asociación mexicana de médicos veterinarios especialistas en bovinos.
31. MELLING, M. 2000. Práctica ovina y caprina. Buenos Aires- Argentina. Intermédica. ISBM: 950-555-230-0.
32. MERINO, R. A. 2003. Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdiva, Chile, Universidad Austral de Chile.
33. MINITUBE. 2003. Manual Triladyl® <http://www.minitube-international.com/>
34. MOBINI, S; HEAT, A; AND PUGH, D. 2002. Sheep and goat medicine, 1 ed. Saunders, Philadelphia, p.186.
35. MUKAIDA, T., TAKAHASHI, K., KASAI, M. 2003, Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique, Reproductive Biomedicine Online, 6:pp. 221-5.
36. MÜLLER, F. 2005. Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen Bovino. 6th Simposio Internacional de Reproducción Animal, Universidad Córdoba.
37. NABIEV, D., GILLES, M., SCHNEIDER, H., MAHABIR, E., WIMMERS, K., PONSUKSILI, S., KOLL, H., SCHELLANDER, H. & K. 2003: Comparison of AndroMed® and tris-egg yolk extender bovine post-thaw sperm function parameters and in vitro fertility. Theriogenology, 1, p.226.
38. PADRÓN, R; FERNÁNDEZ, G. y GALLARDO, M., 1998. Interpretación del análisis seminal. Rev Cubana Endocrinol, 9(1), pp.81-90.

<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30264/1/MesaOrtiz.pdf>

39. PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 1996; 14:pp.127-149.
40. PEREZ, R. 2002. Prediction of fertility by centrifugal countercurrent distribution (CCCD) analysis: correlation between viability and heterogeneity of ram semen and field fertility. *Reproduction*. 123: 869-75.
41. PEZZONE N. (2008), Examen de la calidad del semen para su uso en inseminación artificial. Docente de la Cátedra de Patología Básica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).
42. RAMIREZ, R. 2013. Método para el enfriamiento y criopreservación de semen equino y diluyentes utilizados en dicho método. <http://www.agroinformacion.com> 25/09/09
43. RODRÍGUEZ, F; ÁVILA, C; ANCHONDO, A; SÁNCHEZ, B; JIMÉNEZ, J. 2007. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado y congelado. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chihuahua. México, <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5987/T14.08%20B868c.pdf?sequence=1>.
44. ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. 2004. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 103-09.
45. RUIZ, G., SANTIANI, A., SANDOVAL, M., HUANCA, L., DELGADO, C., CORONADO, S., & ALZAMORA, P. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2), pp. 99-106.

46. SALAMÓN, S. MAXWELL, W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77–111.
47. SANDOVAL, M., SANTIANI, A., RUIZ, G., LEYVA, V., CORONADO, S., & DELGADO, C. 2007. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2), pp. 107-114.
48. SHAW, J. M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 2003: 9: 583-605.
49. SZTEIN, J.; NOBLE, K.; FARLEY, J.; MOBRAATEN, L. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 42: pp.28-39.
50. TERRANOVA EDISON, 2001 Enciclopedia agropecuaria. 2ª edición Colombia 2001, ISBN: 958-9271-25-1. 153-167 pp.
51. VAJTA, G., KUWAYAMA, M. 1998. Improving cryopreservation systems, *Theriogenology*, 65: 236-44.
52. VERA, N. 2009. Caracterización de la función sexual de carneros de la raza Highlander y Suffolk. Tesis.
http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/vera_n/doc/vera_n.pdf
53. WATSON P, y MARTIN, J. 1972. A comparison of changes in acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 28, pp.99 - 101.
54. WILLADSEN, S. 1997. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. *Ciba Found Symp*, 1977, 52: pp.175-201.
55. ZERON, Y., M. TOMCZAK, J. CROWE, A. ARAV. 2000. Electrofusion of

bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 53: p.267.

56. ZHU, S.E.; KASAI, M.; OTOGE, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod and Fert*, 98:pp.139-145.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, antes de ser sometido a criopreservación mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

a. MOTILIDAD MASAL (%)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	26086.98333			
A	1	21244.01667	21244.01667	70379.0	<.0001
B	2	4772.13333	2386.06667	7904.76	<.0001
A*B	2	54.53333	27.26667	90.33	<.0001
Error	54	16.30000	0.30185		
	%CV	DS	MM		
	0.811737	0.549410	67.68333		

Contraste Factor A

Tukey	Media	EE	N	A
A	86.5000	0.10	30	CONGEL
B	48.8667	0.10	30	VITRIF

Contraste Factor B

Tukey	Media	EE	N	B
A	79.5500	0.12	20	TRILADYL
B	65.4500	0.12	20	ANDROMED
C	58.0500	0.12	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

Tukey	Media	EE	N	A	B
A	98.60	0.17	10	CONGEL	TRILADYL
B	85.30	0.17	10	CONGEL	ANDROMED
C	75.60	0.17	10	CONGEL	OVIXCELL
D	60.50	0.17	10	VITRIF	TRILADYL
E	45.60	0.17	10	VITRIF	ANDROMED
F	40.50	0.17	10	VITRIF	OVIXCELL

b. MOTILIDAD INDIVIDUAL (Ptos.)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	77.74583333			
A	1	53.20416667	53.20416667	374.34	<.0001
B	2	14.43333333	7.21666667	50.78	<.0001
A*B	2	2.43333333	1.21666667	8.56	0.0006
Error	54	7.67500000	0.14212963		
	%CV	DS	MM		
	10.74587	0.377001	3.508333		

Contraste Factor A

Tukey	Media	EE	N	A
A	4.45000	0.07	30	CONGEL
B	2.56667	0.07	30	VITRIF

Contraste Factor B

Tukey	Media	EE	N	B
A	4.1250	0.08	20	TRILADYL
B	3.4750	0.08	20	ANDROMED
C	2.9250	0.08	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

Tukey	Media	EE	N	A	B
A	4.95	0.12	10	CONGEL	TRILADYL
B	4.25	0.12	10	CONGEL	ANDROMED
B	4.15	0.12	10	CONGEL	OVIXCELL
C	3.30	0.12	10	VITRIF	TRILADYL
D	2.70	0.12	10	VITRIF	ANDROMED

	E	1.70	0.12	10	VITRIF	OVIXCELL
c. VITALIDAD ESPERMÁTICA (%)						
Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F	
Total	59	26086.98333				
A	1	21244.01667	21244.01667	70379.0	<.0001	
B	2	4772.13333	2386.06667	7904.76	<.0001	
A*B	2	54.53333	27.26667	90.33	<.0001	
Error	54	16.30000	0.30185			
	%CV	DS	MM			
	0.823910	0.549410	66.68333			
Contraste Factor A						
Tukey	Media	EE	N	A		
A	85.5000	0.10	30	CONGEL		
B	47.8667	0.10	30	VITRIF		
Contraste Factor B						
Tukey	Media	EE	N	B		
A	78.5500	0.12	20	TRILADYL		
B	64.4500	0.12	20	ANDROMED		
C	57.0500	0.12	20	OVIXCELL		
Contraste Interacción A*B						
Tukey	Media	EE	N	A	B	
A	97.60	0.17	10	CONGEL	TRILADYL	
B	84.30	0.17	10	CONGEL	ANDROMED	
C	74.60	0.17	10	CONGEL	OVIXCELL	
D	59.50	0.17	10	VITRIF	TRILADYL	
E	44.60	0.17	10	VITRIF	ANDROMED	
F	39.50	0.17	10	VITRIF	OVIXCELL	

Anexo 2. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, a los 45 días de criopreservación luego de ser sometido a vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

a. MOTILIDAD MASAL (%)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	26818.85000			
A	1	12644.01667	12644.01667	47088.1	<.0001
B	2	8166.10000	4083.05000	15205.8	<.0001
A*B	2	5994.23333	2997.11667	11161.7	<.0001
Error	54	14.50000	0.26852		
	%CV	DS	MM		
	3.057155	0.518188	16.95000		

Contraste Factor A

	Tukey	Media	EE	N	A
A		31.4667	0.09	30	CONGEL
B		2.4333	0.09	30	VITRIF

Contraste Factor B

	Tukey	Media	EE	N	B
A		32.5000	0.12	20	TRILADYL
B		13.9500	0.12	20	ANDROMED
C		4.4000	0.12	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

	Tukey	Media	EE	N	A	B
A		60.50	0.16	10	CONGEL	TRILADYL
B		25.40	0.16	10	CONGEL	ANDROMED
C		8.50	0.16	10	CONGEL	OVIXCELL
D		4.50	0.16	10	VITRIF	TRILADYL
E		2.50	0.16	10	VITRIF	ANDROMED
F		0.30	0.16	10	VITRIF	OVIXCELL

b. MOTILIDAD INDIVIDUAL (Ptos.)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	137.5458333			
A	1	113.4375000	113.4375000	825.00	<.0001
B	2	14.4083333	7.2041667	52.39	<.0001
A*B	2	2.2750000	1.1375000	8.27	0.0007
Error	54	7.4250000	0.1375000		
	%CV	DS	MM		
	12.60544	0.370810	2.941667		

Contraste Factor A

	Tukey	Media	EE	N	A
A		4.31667	0.07	30	CONGEL
B		1.56667	0.07	30	VITRIF

Contraste Factor B

	Tukey	Media	EE	N	B
A		3.5500	0.08	20	TRILADYL
B		2.9250	0.08	20	ANDROMED
C		2.3500	0.08	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

	Tukey	Media	EE	N	A	B
A		4.80	0.12	10	CONGEL	TRILADYL
B		4.15	0.12	10	CONGEL	ANDROMED
B		4.00	0.12	10	CONGEL	OVIXCELL
C		2.30	0.12	10	VITRIF	TRILADYL
D		1.70	0.12	10	VITRIF	ANDROMED
E		0.70	0.12	10	VITRIF	OVIXCELL

c. VITALIDAD ESPERMÁTICA (%)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	26525.40000			
A	1	12384.06667	12384.06667	47767.1	<.0001
B	2	7942.90000	3971.45000	15318.5	<.0001
A*B	2	6184.43333	3092.21667	11927.1	<.0001
Error	54	14.00000	0.25926		

%CV	DS	MM
3.162578	0.509175	16.10000

Contraste Factor A

Tukey	Media	EE	N	A
A	30.4667	0.09	30	CONGEL
B	1.7333	0.09	30	VITRIF

Contraste Factor B

Tukey	Media	EE	N	B
A	31.5000	0.11	20	TRILADYL
B	12.9500	0.11	20	ANDROMED
C	3.8500	0.11	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

Tukey	Media	EE	N	A	B
A	59.50	0.16	10	CONGEL	TRILADYL
B	24.40	0.16	10	CONGEL	ANDROMED
C	7.50	0.16	10	CONGEL	OVIXCELL
D	3.50	0.16	10	VITRIF	TRILADYL
E	1.50	0.16	10	VITRIF	ANDROMED
F	0.20	0.16	10	VITRIF	OVIXCELL

Anexo 3. Análisis de varianza de las características microscópicas de semen heterospérmico de carnero, a los 45 días de criopreservación luego de ser sometido a vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales.

a. MOTILIDAD MASAL (%)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	26663.65000			
A	1	12586.01667	12586.01667	51881.3	<.0001
B	2	8091.10000	4045.55000	16676.3	<.0001
A*B	2	5973.43333	2986.71667	12311.7	<.0001
Error	54	13.10000	0.24259		
	%CV	DS	MM		
	2.923068	0.492537	16.85000		

Contraste Factor A

	Tukey	Media	EE	N	A
A		31.3333	0.09	30	CONGEL
B		2.3667	0.09	30	VITRIF

Contraste Factor B

	Tukey	Media	EE	N	B
A		32.3500	0.11	20	TRILADYL
B		13.8000	0.11	20	ANDROMED
C		4.4000	0.11	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

	Tukey	Media	EE	N	A	B
A		60.30	0.16	10	CONGEL	TRILADYL
B		25.20	0.16	10	CONGEL	ANDROMED
C		8.50	0.16	10	CONGEL	OVIXCELL
D		4.40	0.16	10	VITRIF	TRILADYL
E		2.40	0.16	10	VITRIF	ANDROMED
F		0.30	0.16	10	VITRIF	OVIXCELL

b. MOTILIDAD INDIVIDUAL (Ptos.)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	163.4833333			
A	1	132.0166667	132.0166667	1080.14	<.0001
B	2	19.6333333	9.8166667	80.32	<.0001
A*B	2	5.2333333	2.6166667	21.41	<.0001
Error	54	6.6000000	0.1222222		
	%CV	DS	MM		
	12.41194	0.349603	2.816667		

Contraste Factor A

	Tukey	Media	EE	N	A
A		4.30000	0.06	30	CONGEL
B		1.33333	0.06	30	VITRIF

Contraste Factor B

	Tukey	Media	EE	N	B
A		3.5000	0.08	20	TRILADYL
B		2.8500	0.08	20	ANDROMED
C		2.1000	0.08	20	OVIXCELL

Contraste Interacción A*B

	Tukey	Media	EE	N	A	B
A		4.80	0.11	10	CONGEL	TRILADYL
B		4.10	0.11	10	CONGEL	ANDROMED
B		4.00	0.11	10	CONGEL	OVIXCELL
C		2.20	0.11	10	VITRIF	TRILADYL
D		1.60	0.11	10	VITRIF	ANDROMED
E		0.20	0.11	10	VITRIF	OVIXCELL

c. VITALIDAD ESPERMÁTICA (%)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	59	26478.85000			
A	1	12355.35000	12355.35000	57024.7	<.0001
B	2	7905.90000	3952.95000	18244.4	<.0001
A*B	2	6205.90000	3102.95000	14321.3	<.0001
Error	54	11.70000	0.21667		
	%CV	DS	MM		
	2.918336	0.465475	15.95000		

Contraste Factor A

	Tukey	Media	EE	N	A
	A	30.3000	0.08	30	CONGEL
	B	1.6000	0.08	30	VITRIF

Contraste Factor B

	Tukey	Media	EE	N	B
	A	31.3000	0.10	20	TRILADYL
	B	12.8500	0.10	20	ANDROMED
	C	3.7000	0.10	20	OVI XCELL

Contraste Interacción A*B

	Tukey	Media	EE	N	A	B
	A	59.30	0.15	10	CONGEL	TRILADYL
	B	24.30	0.15	10	CONGEL	ANDROMED
	C	7.30	0.15	10	CONGEL	OVI XCELL
	D	3.30	0.15	10	VITRIF	TRILADYL
	E	1.40	0.15	10	VITRIF	ANDROMED
	F	0.10	0.15	10	VITRIF	OVI XCELL